



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“RELACIÓN ENTRE LA SECUENCIA DEL GEN NS1
VIRAL Y LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA POR
ELISA EN CASOS DE DENGUE”:**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

JERUSALÉN ISLAS ARENAS

ASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO

COASESORA: M. EN C. KARINA RUIZ TOVAR

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO
 SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

“Relación entre la secuencia del gen NS1 viral y la detección de la proteína por ELISA en casos de dengue”

Que presenta la pasante: Jerusalén Islas Arenas

Con número de cuenta: 305067496 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otórgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).

HHA/pm

Dedicatorias

A mis papás, por el cariño y apoyo que me han brindado. Gracias por la confianza que han depositado en mí para llegar a esta meta esperando sea la primera de muchas en mi formación profesional, gracias por entender lo que significa esto para mí y no dejarme sola cuando las cosas no van como deben. Gracias mamá por escucharme siempre paciente y darme ánimo cada vez que lo necesito, gracias por hacerme creer en mi misma.

A mi hermano y hermanas, porque todo lo que aprendo de ustedes y por todo lo que han compartido conmigo como familia y como compañeros de trabajo, gracias por regañarme cuando lo necesito y buscar siempre mi realización como persona.

A Dios, por la vida que me ha prestado, por las personas de las que me ha rodeado, porque todas han llegado y se han ido a su tiempo. Gracias por recibirme con los brazos abiertos siempre que te necesito.

A mis compañeros y profesores con los que topé y compartí cada etapa de este camino, gracias por marcarme con sus enseñanzas dentro y fuera del salón de clases. Gracias a mi amiga Laura por el tiempo compartido y la confianza que nos tenemos.

Agradecimientos

Al Dr. Salvador Fonseca y la M. en C. Karina Ruíz por aceptar dirigir mi trabajo de tesis, por su paciencia, enseñanzas, recomendaciones y disposición para que este trabajo llegara a buen fin y sobre todo, por la confianza de brindarme su amistad. Gracias a los compañeros de este grupo de trabajo por influir positivamente en mi formación académica y personal.

Al Dr. Alejandro Escobar por su disponibilidad para llevar a cabo la primer etapa experimental en sus laboratorios y por postularme para la obtención de una beca. Agradezco también al personal y compañeros tesistas del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del InDRE por compartir conmigo sus conocimientos y sus ratos libres.

A la M. en C. Pilar Rivera por su colaboración para la obtención del material biológico empleado y al Dr. Gilberto Vaughan por los conocimientos que compartió conmigo.

Al Dr. José Francisco Montiel y la I.A Ana Elvia Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular, FESC por las facilidades otorgadas para culminar este trabajo y participarme de temas de actualidad.

Finalmente agradezco a los profesores del colegio de Inmunología, por sus observaciones para mejorar mi trabajo de tesis.

Apoyos recibidos

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, bajo la dirección del Dr. Salvador Fonseca Coronado y en el Laboratorio de Inmunología Especial del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud, bajo la dirección de la M. en C. Karina Ruiz Tovar.

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo para Cátedras de Investigación, Vinculación y Educación (PACIVE) de la UNAM, mediante el proyecto NCOS-04 *“Relación entre la secuencia del gen NS1 viral y la detección de la proteína por ELISA en casos de dengue”* y por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACyT, mediante el proyecto Salud 2011-C01-161716 *“Desarrollo de un modelo predictivo de cuadros hemorrágicos debidos al virus del dengue basado en el análisis de polimorfismos de nucleótidos únicos presentes en el promotor de DC-SIGN y TNF-alfa y en la secuenciación completa del gen E viral”*.

La sustentante recibió el apoyo S0008-2010-01-139542-01-051 del CONACyT debido a su participación como estudiante asociado del proyecto Salud-2010-C01-139542 *“Análisis de la genética de poblaciones virales, marcadores moleculares del genoma viral y factores inmunológicos del hospedero relacionados con virulencia y la presentación clínica de la enfermedad en casos graves y atípicos de dengue”*, durante el periodo de junio a noviembre de 2012. Así mismo, fue beneficiaria del programa de Becas Tesis 2012 del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (registro 12BTL0178) y se le otorgó la beca número 20120016725 por parte de la Secretaría de Educación Pública, dentro del programa Becas de Titulación 2012.

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Dengue: aspectos clínicos	1
1.2 Virus del dengue	3
1.2.1 Estructura y genoma viral	3
1.2.2 Ciclo de replicación viral	4
1.3 Situación en México	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Diagnóstico de dengue en México	7
2.2 La proteína NS1 viral	8
2.3 Proteína sNS1 como herramienta de diagnóstico	10
2.3.1 Evaluación de Platelia™ Dengue NS1 Ag en pacientes mexicanos	13
2.4 Mutación de virus RNA	14
2.5 Predicción de epítomos	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1 Objetivos particulares	17
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1 Muestras biológicas	19
7.2 Purificación de RNA viral	19
7.3 Detección del genoma viral en suero	20
7.4 Amplificación de la región NS1 viral	22
7.4.1 Purificación de amplicones	24
7.6 Secuenciación	25
7.7 Análisis bioinformático	25
8. RESULTADOS	27
9. DISCUSIÓN	44
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	50
12. REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Fig. 1	<i>Aedes aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> , vectores del DENV.	1
Fig. 2	Clasificación clínica del dengue.	2
Fig. 3	Estructura y genoma del virus del dengue.	3
Fig. 4	Distribución topológica y procesamiento de la poliproteína viral durante la replicación del DENV.	5
Fig. 5	Incidencia y serotipos virales aislados de casos confirmados de dengue por entidad federativa en México durante 2012.	6
Fig. 6	Algoritmo de diagnóstico de dengue en México.	8
Fig. 7	(A) Tinción negativa de sNS1 en crio microscopía electrónica y (B) reconstrucción 3D.	9
Fig. 8	Detección de sNS1 mediante el ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag.	12
Fig. 9	Cobertura de amplificación de la región C-prM del genoma del DENV descrita por Chien y cols. 2006.	20
Fig. 10	(A) Formato del sistema comercial E-Gel Size Select y (B) cámara horizontal para la purificación de amplicones por electroforesis en agarosa al 2%	24
Fig. 11	Amplificación de la región C-prM del genoma del DENV (511pb) en muestras de suero de casos sospechosos.	27
Fig. 12	Muestras RT-PCR + con resultado positivo y negativo a la detección de NS1 del DENV por ELISA en casos de dengue.	28
Fig. 13	Cobertura de amplificación de la región NS1 del genoma del DENV-1.	29
Fig. 14	Cobertura de amplificación de la región NS1 del genoma del DENV-2.	30
Fig. 15	(A) Amplificación de la región codificante de NS1 del DENV-1 y (B) del DENV-2 a partir de muestras de suero de casos sospechosos.	31
Fig. 16	Amplificación de la región codificante de NS1 del DENV-2 a partir de muestras de suero de casos confirmados.	31
Fig. 17	Gel representativo que corrobora la purificación de los productos de amplificación de la región NS1 de muestras negativas y positivas a la proteína NS1 por ELISA.	32

Fig. 18	Electroferograma de secuenciación capilar de la región NS1 viral del DENV-2 en casos negativos a NS1 por ELISA.	34
Fig. 19	Análisis de identidad de secuencias NS1 de DENV-2 de muestras negativas a la proteína NS1 por inmunoensayo.	35
Fig. 20	Análisis filogenético (Neighbor-Joining) de la región NS1 viral de secuencias mexicanas de DENV-2.	37
Fig. 21	Análisis de diversidad nucleotídica de la región NS1 de DENV-2 en muestras negativas y positivas a la proteína NS1 por ELISA.	41
Fig. 22	Análisis de diversidad nucleotídica de la región NS1 de DENV-2 en secuencias NS1 negativas al ELISA y secuencias NS1 mexicanas de referencia del periodo 1983-2008.	41
Fig. 23	Propensión antigénica de la proteína NS1(A) nativa y (B) modificada.	42

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag según el serotipo viral infectante	12
Tabla 2.	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag en función de la aparición de los síntomas	12
Tabla 3.	Sensibilidad de Platelia™ Dengue NS1 Ag en función de la evolución de la enfermedad en pacientes mexicanos infectados por DENV	14
Tabla 4.	Verificación de la pureza de los amplicones de NS1 viral por espectrofotometría.	33
Tabla 5.	Aislados mexicanos de DENV-2 publicados en el Gen Bank	36
Tabla 6.	Cambios de nucleótido asociados con la negatividad del ELISA para detectar la proteína NS1 de DENV-2	40
Tabla 7.	Diversidad genética de la región NS1 viral de muestras positivas y negativas al ELISA en casos de dengue	39
Tabla 8.	Determinantes antigénicos propuestos para la proteína NS1 nativa y modificada según el método de Kolaskar y Tongaonkar	43

ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
ATCC	Cepas tipo (del inglés <i>American Type Culture Collection</i>)
AVE	Buffer de elusión
AW1	Buffer de lavado 1
AW2	Buffer de lavado 2
BrEt	Bromuro de Etidio
cDNA	DNA complementario
DENV	Virus del dengue
ELISA	Ensayo inmuno-enzimático (del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
LESP	Laboratorio Estatal de Salud Pública
mNS1	Proteína NS1 asociada a membrana celular
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
mRNA	RNA mensajero
SCD	Síndrome de choque por dengue
sNS1	Forma soluble de la proteína NS1

RESUMEN

El dengue es una enfermedad febril, en ocasiones hemorrágica, que es producida por los virus del dengue (DENV-1 a DENV-4). El algoritmo para el diagnóstico confirmatorio se basa, principalmente, en la detección del antígeno NS1 viral por ELISA en el suero del paciente durante los primeros 5 días desde la aparición de síntomas. El equipo comercial más empleado presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad entre el 90 y el 97 % dependiendo de la población de estudio lo cual implica una subestimación del número de casos positivos. En este trabajo, se analizó la secuencia de la región NS1 de virus responsables de casos de dengue con resultado positivo y negativo a la detección de la proteína por ELISA, en busca de mutaciones que pudieran afectar la sensibilidad del equipo de diagnóstico.

Se seleccionaron sueros de pacientes con sintomatología de dengue y resultado positivo (NS1+, n=20) o negativo (NS1-, n=172) a la detección de NS1 por ELISA y negativos por ELISA a IgM e IgG anti-DENV. En el 100% de las muestras NS1+ se confirmó la presencia del genoma viral por amplificación de la región C-prM, mientras que en el 5% de las NS1- se logró esta identificación (n=9). A partir de estas muestras se amplificó y secuenció la región NS1 con iniciadores serotipo-específicos, observándose la presencia de DENV-1 y 2 en las NS1+, mientras que para las NS1- solo se identificó DENV-2, por lo que el análisis bioinformático incluyó solo secuencias positivas y negativas a NS1 por ELISA del serotipo 2 del DENV. Este análisis, mostró que existe relación filogenética entre las secuencias NS1 negativas que les permite agruparse entre sí y con aquellas con resultado positivo al ELISA y otras correspondientes a años anteriores. El análisis de las secuencias nucleotídicas reveló que las muestras NS1 negativas muestran múltiples sustituciones con respecto a las que poseen un resultado positivo al ELISA las cuales se reúnen en la región comprendida entre 750 y 1000 pb, generando cambios fenotípicos (sustitución de aminoácido) en las posiciones 112 (Lys→Arg) y 217 (Phe→Leu), donde la primera se encontró incluida en un epítipo lineal que se pierde con el cambio de aminoácido lo que podría influir en la sensibilidad del equipo comercial de ELISA para detectar la proteína NS1 en las infecciones ocasionadas por DENV-2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dengue: aspectos clínicos

El origen del término “dengue” no está claro, pero se cree que deriva de la frase swahili "ka-dinga pepo", que significa "calambre o convulsión causada por un espíritu maligno" (Halstead, 2008). Es una enfermedad infecciosa ocasionada por alguno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a 4), que a su vez es transmitido a los humanos por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes* (*Stegomyia*), principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (figura 1) y que se distribuyen ampliamente en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Aaskov, 2003; Lemos, 2006; Cabezas, 2011; Rothman, 2011).



Fig. 1. *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*, vectores del DENV (<http://fmel.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>).

Independientemente del serotipo viral infectante, la infección por DENV puede cursar por cuadros clínicos distintos: dengue sin signos de alarma (antes llamado fiebre por dengue), el dengue con signos de alarma y dengue grave (previamente agrupados como fiebre hemorrágica por dengue) (figura 2). La forma sin signos de alarma a menudo se resuelve sin complicaciones en la mayoría de los casos, sin embargo, durante una infección secundaria, la presencia de signos de alarma permite identificar tempranamente la probabilidad de evolución a dengue grave,

donde la falta de atención médica ocasiona un desenlace fatal (Gulati y Maheshwari,2007; OPS Honduras, 2011; Rothman, 2011).

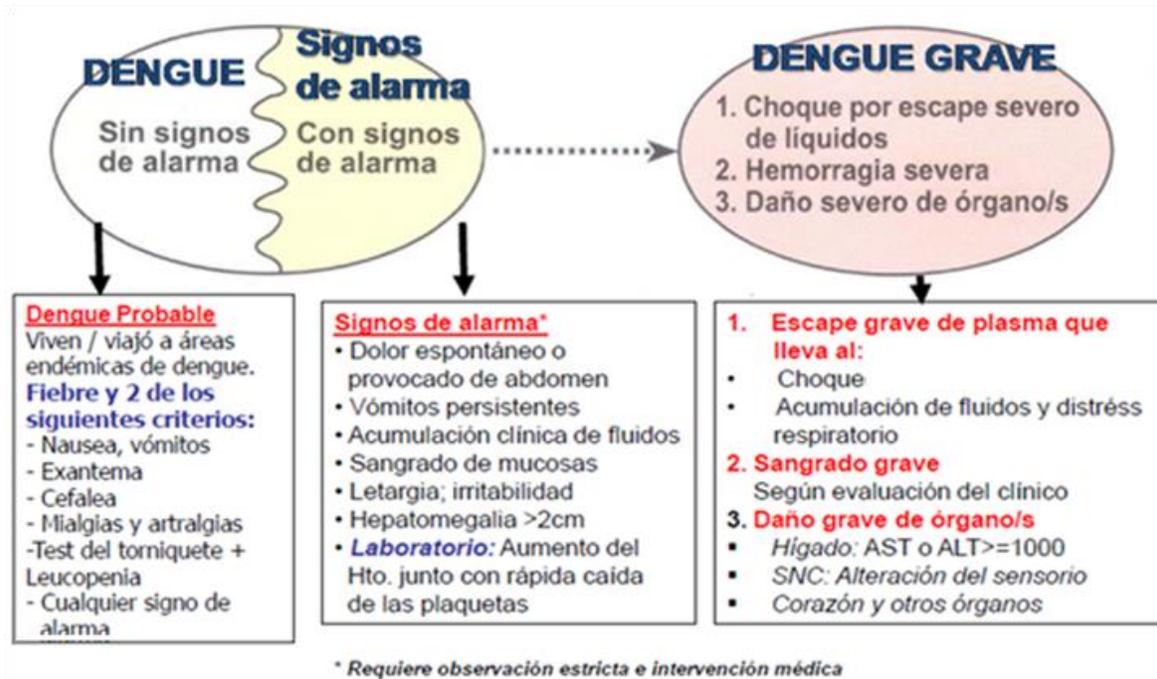


Fig. 2. Clasificación clínica del dengue (OPS, 2011).

De acuerdo al tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas, se reconocen tres fases en la infección por DENV: la fase aguda o febril (día 0-5); la fase efervescente (día 6-10); y fase convaleciente tardía o de recuperación (más de 11 días). Durante la fase efervescente, el paciente debe mantenerse en observación ya que pueden presentarse síntomas que denotan agravamiento (OPS, 2011; Rothman, 2011).

En la actualidad, no existe un tratamiento antiviral específico para el dengue, de manera que el tratamiento se basa en la administración de analgésicos, rehidratación y recomendación de reposo y terapia de soporte en los casos graves (Gulati y Maheshwari, 2007; Secretaría de Salud, 2008).

1.2 Virus del dengue

1.2.1 Estructura y genoma viral

El DENV es un flavivirus y pertenece a la familia *Flaviviridae*. Es un virus envuelto en cuya membrana se proyectan las proteínas de membrana (M) y de envoltura (E), tiene apariencia esférica y mide aproximadamente 40 a 50 nm de diámetro, además, posee por genoma RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, protegido por una cápside icosaédrica para dar lugar a la nucleocápside viral (figura 3) (Gulati y Maheshwari, 2007; Rothman, 2011; Velandia y Castellanos, 2011). El RNA del DENV contiene aproximadamente 10.7 Kb y está flanqueado por regiones no codificantes (UTR, del inglés *untranslate region*) en sus extremos 3' y 5', presenta una estructura Cap en su extremo 5' y carece de segmento poliA en su extremo 3'. Además, contiene un marco de lectura abierto que da lugar a una poliproteína que es procesada en tres proteínas estructurales (de cápside, C; de membrana y de envoltura) localizadas hacia el extremo amino terminal (5') y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) hacia el extremo carboxilo terminal (3') (figura 3) (Aaskov, 2003; Kurosu, 2011; Smit y cols., 2011).

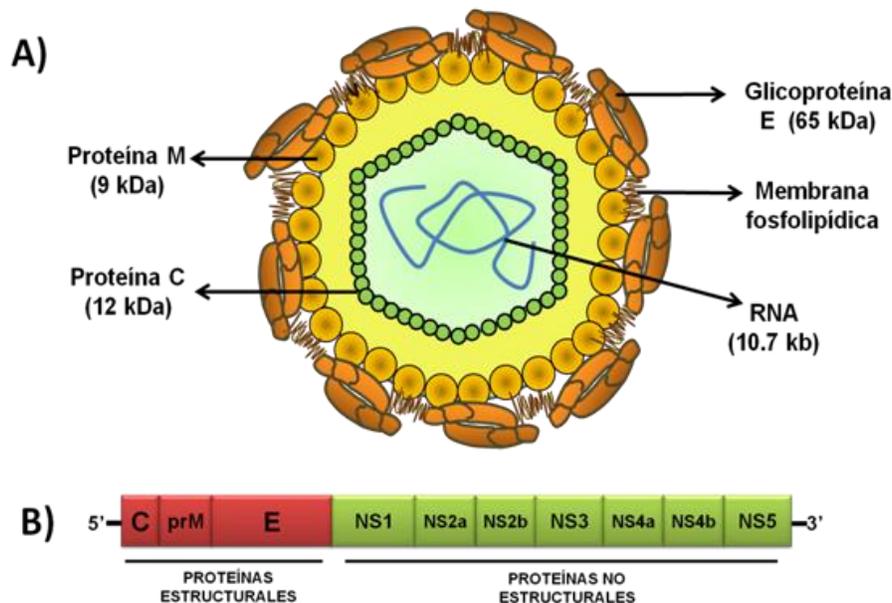


Fig. 3. (A) Estructura y (B) genoma del virus del dengue (Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz Tovar).

Las proteínas no estructurales cumplen funciones específicas durante la replicación viral, aunque todavía no se ha descrito la función de la NS1. Así, las proteínas NS2A, NS4A y NS4B actúan como inhibidores de la señalización de interferón (IFN) tipo I. La proteína NS3 presenta actividad de serina-proteasa, NTPasa y helicasa. NS2A tiene actividad en el ensamblaje de las partículas virales y NS2B forma un complejo estable con NS3 para la cual funge como cofactor para su actividad de serina-proteasa. NS4A señala la translocación de NS4B al lumen del retículo endoplásmico (RE) y está implicada en el reordenamiento de las membranas celulares durante la replicación viral. NS4B también interactúa con NS3 para regular la replicación del RNA. Finalmente, NS5 funge como RNA-polimerasa viral y presenta un sitio de unión para formar el complejo replicasa con NS3, además de que presenta actividad de metiltransferasa (Yábar, 2003; Knipey Howley, 2007; Smit y cols., 2011; Idrees y Ashfaq, 2012).

1.2.2 Ciclo de replicación viral.

Los DENV muestran patrones similares de diseminación sistémica con tropismo por células fagocíticas mononucleares principalmente, como los monocitos, macrófagos y las células dendríticas (Clyde y cols., 2006; Rodenhuis y cols., 2010; Rothman, 2011). La entrada del virus se inicia cuando el dominio III de la proteína E interacciona con su receptor en la célula hospedera, el mejor caracterizado es CD209 o DC-SIGN (del inglés *Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*) (Velandia y Castellanos, 2011; Wahala y cols., 2011).

El DENV infecta las células por endocitosis mediada por receptor, formando una vesícula endocítica, en la cual se acidifica el pH dando lugar a cambios conformacionales en el dominio II de la proteína E para favorecer la exposición y anclaje del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, lo que permite la fusión de las membranas viral y endosomal, para liberar la nucleocápside viral al citoplasma (Laughlin y cols., 2012; Velandia y Castellanos, 2011). El RNA en el citoplasma se traduce en una poliproteína, la cual se ancla a la membrana del RE

formando el complejo de replicación y es procesada en proteínas individuales por proteasas virales y celulares simultáneamente (figura 4) (Velandia y Castellanos, 2011; Wahala y cols., 2011).

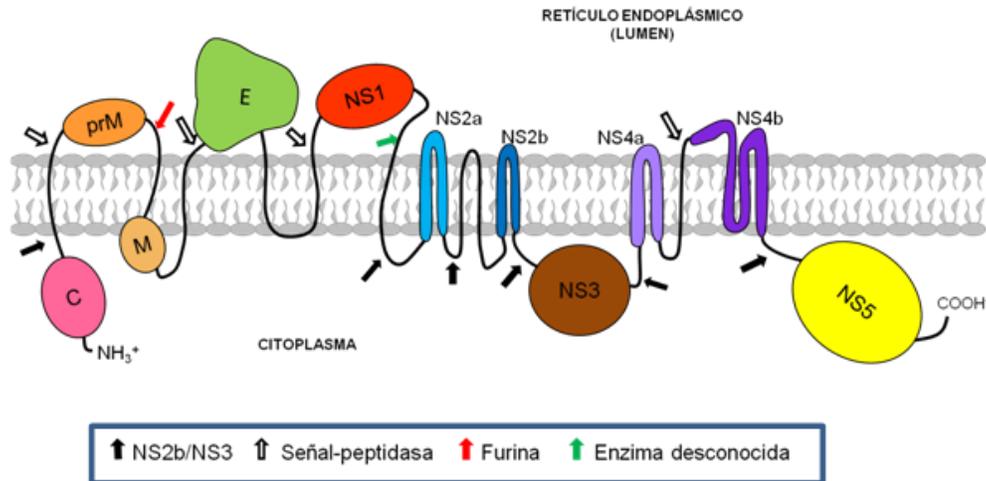


Fig. 4. Distribución topológica y procesamiento de la poliproteína viral en el RE durante la replicación del DENV (Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz Tovar).

Durante el proceso de replicación, se generan cadenas de RNA de polaridad negativa (intermediario de replicación) que sirven como molde para la síntesis de cadenas de polaridad positiva (Yábar, 2003; Clyde y cols, 2006; Knipe y Howley, 2007). El proceso de ensamblaje tiene lugar en distensiones del RE y comienza con la formación de la nucleocápside por la interacción RNA viral-proteína C, sobre la cual se asocian las proteínas prM y E, que están ancladas en la membrana del RE. Posteriormente, se llevan a cabo dos etapas de maduración de la partícula viral, primero, las proteínas prM y E se organizan en forma heterodimérica y en un segundo paso, la partícula inmadura transita dentro de vesículas desde el RE hasta el aparato de Golgi, donde ocurren cambios de conformación de la proteína E generando homotrómeros de la misma. Un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM por la proteasa furina en el Golgi, corta y escinde al péptido pr (Velandia y Castellanos, 2011). Finalmente, los viriones son liberados por exocitosis y el pH neutro del espacio extracelular induce el reordenamiento en homodímeros de la proteína E, indicando la maduración de la partícula viral (Velandia y Castellanos, 2011; Wahala y cols., 2011).

1.3 Situación en México

A principios de 1970, como resultado de la campaña de erradicación de la fiebre amarilla y malaria, se logró la eliminación del mosquito *Ae. aegypti* contribuyendo a eliminar la transmisión de dengue en México, sin embargo, este reingresó y se extendió en el territorio nacional a finales de esta misma década (Gluber, 1998; Lemos, 2006). En la actualidad, el dengue presenta variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos, en particular en los estados de la región sureste y costas del Océano Pacífico y Golfo de México, con eventos epidemiológicos más esporádicos en los estados del centro y norte del país (figura 5) (Gibbons y Vaughn, 2002; Secretaría de Salud, 2008).



Fig. 5. Incidencia y serotipos virales aislados en casos confirmados de dengue por entidad federativa en México durante 2012 (www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue.html).

Hasta la semana 51 del año 2012, la Secretaría de Salud reportó un total de 50,013 casos confirmados de dengue, de los cuales el 35% correspondieron a dengue con signos de alarma y 65% a dengue sin signos de alarma. Durante ese año se tuvo conocimiento de 64 defunciones y el total de casos confirmados se incrementó en un 225.4% respecto al 2011. El estado de Veracruz reportó el mayor número de casos (12,505) y los principales serotipos circulantes fueron

DENV-1 y DENV-2, con proporciones muy semejantes, seguidos de DENV-4 y -3 con menor número de casos (figura 5) (www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue.html).

2. ANTECEDENTES

2.1 Diagnóstico de dengue en México

De acuerdo con el algoritmo vigente a partir de 2008, el diagnóstico de dengue se realiza con muestras de suero obtenidas a partir del inicio de la fiebre, éstas son clasificadas y procesadas según el tiempo transcurrido después de dicho evento (figura 6):

A) Muestras obtenidas entre 0-5 días

El procedimiento más utilizado consiste en la detección del antígeno viral NS1 por ELISA, si el resultado es positivo, se confirma el caso. Si el resultado es negativo y la toma de muestra corresponde al cuarto o quinto día, se realiza un ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgG. Cuando la muestra es de un paciente con 0 a 3 días de inicio de fiebre, se determinan anticuerpos IgM por ELISA, en ambos casos un resultado positivo confirma el caso. Si el resultado de IgM es negativo, se realiza la determinación de anticuerpos IgG. Si el resultado de esta determinación es positivo el caso es confirmado (Secretaría de Salud, 2008).

B) Muestras obtenidas a partir del día 6

Únicamente se realiza la determinación de anticuerpos de tipo IgM e IgG por ELISA. En ambos casos, un resultado positivo confirma el caso.

Para vigilancia virológica y epidemiológica, se selecciona el 10% de las muestras positivas a NS1 en casos de FD y el 100% en casos de FHD para realizar cultivo y aislamiento viral e identificación de serotipos por inmunofluorescencia, así como para realizar RT-PCR en todas las formas graves y en casos de extrema urgencia (Secretaría de Salud, 2008).

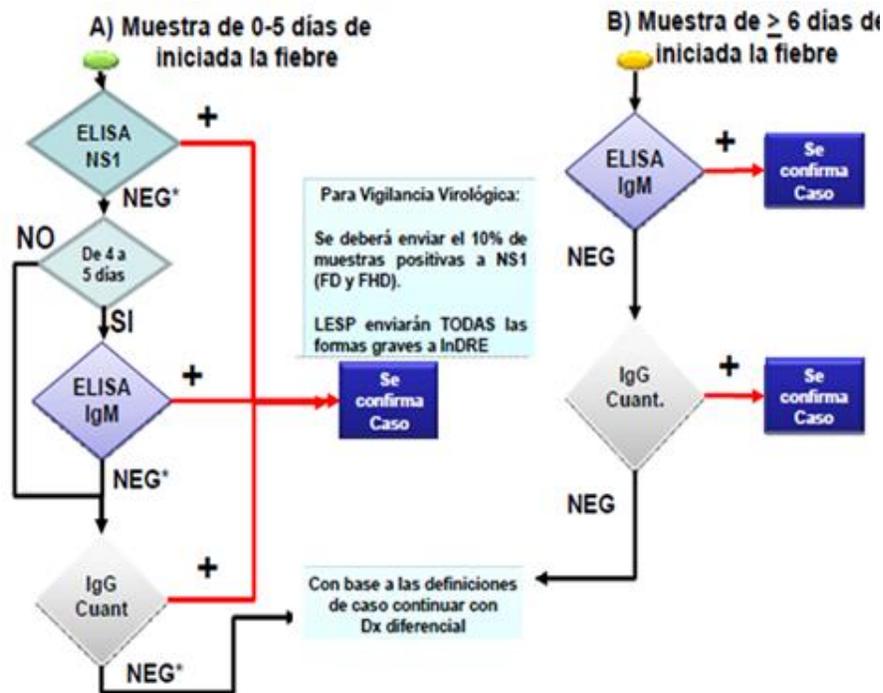


Fig. 6. Algoritmo de diagnóstico de dengue en México (Secretaría de Salud, 2008).

2.2 La proteína NS1 viral

La glicoproteína NS1 es una molécula altamente conservada entre los flavivirus, que puede encontrarse en las células infectadas (forma intracelular), en la membrana celular (forma membranal mNS1) o en el medio extracelular (forma soluble sNS1). Es una proteína de aproximadamente 46 kDa codificada por un fragmento de RNA viral de 1,056 nucleótidos que da lugar a 352 aminoácidos y contiene 12 Cys conservadas que forman enlaces disulfuro. Esta proteína tiene dos sitios de glicosilación de tipo Asn-X-Ser/Thr en las posiciones 130 y 207 y su secuencia de aminoácidos es específica para cada serotipo de DENV (Yábar, 2003; Knipe y Howley, 2007; Rothman, 2011; Muller y cols., 2012).

La forma intracelular de NS1 es un monómero hidrofílico que se ubica en el lumen del RE, se procesa alrededor de 30 minutos después de su síntesis para ser glicosilada con residuos de manosa y genera homodímeros hidrófobos altamente estables, que se asocian a la membrana celular probablemente a través de anclaje

glicosilfosfatidilinositol o por interacciones con heparán sulfato (mNS1). Posteriormente, NS1 se ensambla en forma de hexámeros de aproximadamente 10 nm conformadas por tres homodímeros unidos por interacciones hidrofóbicas (sNS1). En sNS1 los sitios de glicosilación se encuentran ocupados por complejos glucano constituidos por N-acetilglucosamina, manosa y fucosa (Wallis y cols., 2004; Avirutnan y cols., 2007; Knipe y Howley, 2007).

Las investigaciones recientes se han enfocado en determinar la estructura 3D de sNS1 mediante criomicroscopía electrónica, debido a que no ha sido posible su cristalización. Los estudios más representativos corresponden al análisis de formas nativas de NS1 de DENV-1 purificadas a partir de cultivo en células Vero y en partículas recombinantes de DENV-2 producidas en baculovirus, las cuales poseen características biofísicas y antigénicas semejantes al hexámero nativo. El peso molecular estimado para formas nativas y recombinantes oscila entre 250 y 350 kDa, con una estructura semejante a un barril abierto, que posee un canal central amplio que contiene lípidos: triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos (figura 7) (Flamand y cols., 1999; Gutschea y cols., 2011; Muller y cols., 2012).

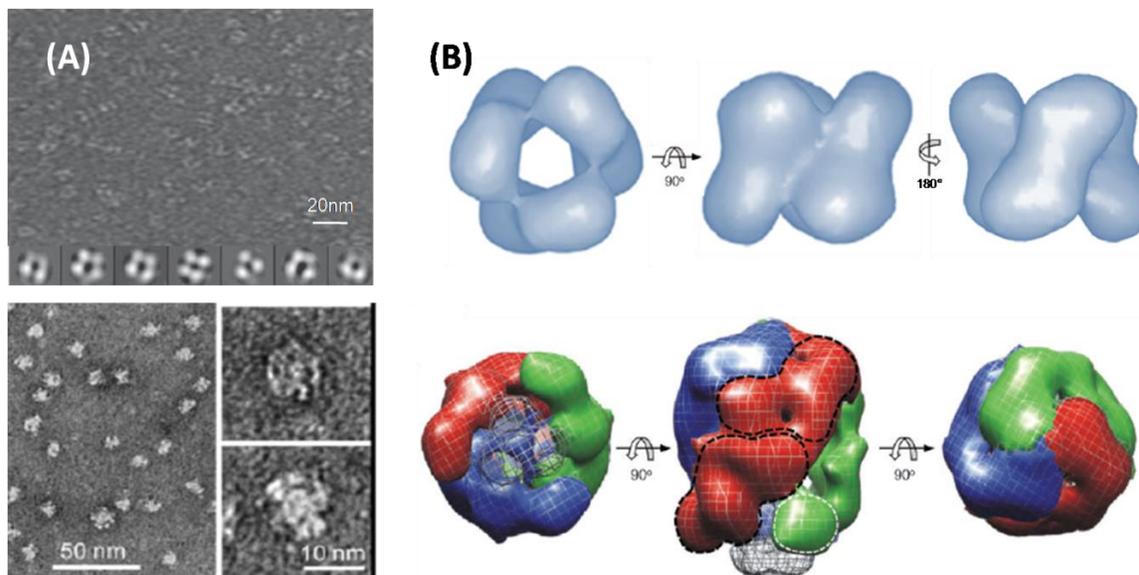


Fig. 7. (A) Tinción negativa de sNS1 en criomicroscopía electrónica y (B) reconstrucción 3D (Gutschea y cols., 2011; Muller y cols., 2012).

Se cree que la proteína NS1 tiene funciones durante la replicación del DENV que no se han logrado caracterizar, sin embargo, se sabe que se localiza en el sitio de replicación viral, lo que sugiere su participación en el montaje del complejo replicasa viral (NS5/NS3) (Yábar, 2003; Knipe y Howley, 2007). Por otro lado, con el uso de mutantes de la proteína, se ha observado una importante reducción en la replicación que conduce a la atenuación viral, así como su co-localización con formas replicativas del DENV (Wallis y cols., 2004; Muller, 2010). La función de las formas extracelulares de NS1 tampoco ha quedado clara, pero se sabe que durante la infección viral se genera una fuerte respuesta humoral sin capacidad neutralizante ya que esta proteína no está presente en viriones maduros, sin embargo, los anticuerpos producidos contra mNS1 dirigen la lisis mediada por complemento, lo cual se asocia con el daño vascular por depósito sobre las paredes del endotelio capilar contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad (Yábar, 2003; Muller, 2010).

2.3 Proteína sNS1 como herramienta de diagnóstico

El principal reto asociado al tratamiento de los pacientes con dengue es la rapidez y especificidad para llevar a cabo la confirmación de los casos, por lo que el factor más importante es la detección oportuna del DENV durante la etapa febril de la enfermedad y por lo cual es aprovechada la secreción de NS1 de las células infectadas, ya que la hace susceptible a su detección en el suero de los pacientes desde el primer y hasta el noveno día posterior a la aparición de la fiebre, de modo semejante en las formas primaria y secundaria de la infección, de hecho, se han elaborado, estandarizado y validado diversos equipos de diagnóstico serológico para este fin (Flamand y cols., 1999; Shu y cols., 2003; Acosta y cols., 2005; BIO-RAD, 2005).

El antígeno sNS1 circula de manera uniforme en el plasma de los pacientes infectados con cualquiera de los serotipos del DENV y en niveles elevados durante los primeros días de la enfermedad (Young y cols., 2000). Los niveles de esta

proteína varían entre 0.04 a 2.0 mg/mL durante la fase aguda y durante la fase de convalecencia iguales o menores a 0.04µg/mL por lo que su mayor tasa de detección en suero ocurre en la fase aguda (Jacobs y cols., 2000; Libraty y cols., 2002; Muller, 2010). Los pacientes que experimentan una infección secundaria muestran pobre detección de sNS1 asociada con la formación de complejos inmunitarios IgG-sNS1, sin embargo, niveles mayores a 600ng/mL durante las primeras 72 horas posteriores al cuadro febril de una infección secundaria, predisponen fuertemente al desarrollo de una fase hemorrágica (Libraty y cols., 2002; Muller, 2010).

Entre los métodos de detección de sNS1 se encuentran la inmunocromatografía y el ELISA, los cuales, aunque son muy sensibles y específicos (mayores al 70 y 95%, respectivamente) no brindan información del serotipo infectante y un resultado negativo no es totalmente excluyente de infección (Young y cols., 2000; Alcon y cols., 2002; Shu y cols., 2003).

Actualmente, el equipo de ELISA comercial más utilizado a nivel mundial por sus altos niveles de sensibilidad (91%) es Platelia™ Dengue NS1 Ag de BIO-RAD, que consiste en una modalidad de tipo sándwich para la detección cualitativa o semi cuantitativa del antígeno sNS1 en suero o plasma humano. Esta prueba utiliza anticuerpos monoclonales (AcMo) de ratón anti-sNS1 para su captura y detección. Las muestras de pacientes y los controles correspondientes (negativo, de valor umbral y positivo) son incubados sobre una placa sensibilizada con anticuerpos de captura anti-sNS1. Posteriormente, la placa se incuba con un anticuerpo conjugado con peroxidasa, de modo que en presencia del antígeno sNS1 se forma un complejo AcMo-sNS1-AcMo/peroxidasa (figura 8) el cual genera una reacción colorida con la adición del sustrato de la peroxidasa y un cromógeno. La densidad óptica de las muestras a 450 nm es proporcional a la cantidad de antígeno sNS1 presente en la muestra (BIO-RAD, 2005).

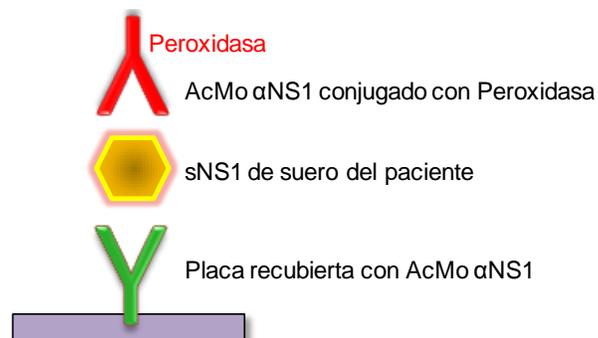


Fig. 8. Detección de sNS1 mediante el ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag (BIO-RAD, 2005).

La sensibilidad reportada por el fabricante de esta prueba (91%), fue calculada con sueros de pacientes con infección aguda por DENV confirmada por RT-PCR, con un intervalo de confianza (IC) del 95%: 85.8%-94.8% y no se observó diferencia significativa según el serotipo viral infectante (tabla 1 y 2) (BIO-RAD, 2005).

Tabla 1. Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag según el serotipo viral infectante (n=177) (BIO-RAD, 2005).

Serotipo	Número de sueros	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag (IC 95%)
1	93	88,9% (85,8% - 94,8%)
2	31	87,1% (70,1% - 96,3%)
3	24	100,0% (85,6% - 100,0%)
4	29	93,3% (77,9% - 97,9%)

Tabla 2. Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag en función de la aparición de los síntomas (n=177) (BIO-RAD, 2005).

Días posteriores a la aparición de la fiebre	Número de sueros	Sensibilidad de la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag
0	10	100,0%
1	33	87,8%
2	40	92,5%
3	20	95,0%
4	27	96,3%
5	19	52,6%
≥ 6	28	35,7%

En cuanto a la especificidad, esta se calculó con 618 muestras de suero de donadores sanos y de pacientes hospitalizados por enfermedades no relacionadas con dengue y no se observó ningún resultado positivo en la población estudiada, de modo que la especificidad de la prueba fue del 100,00% (IC= 95%: 99,4%-100,0%) (BIO-RAD, 2005).

2.3.1 Evaluación de Platelia™ Dengue NS1 Ag en pacientes mexicanos

Existen múltiples reportes internacionales de la sensibilidad de Platelia™ Dengue NS1 Ag (Dusart y cols., 2006; Kumarasamy y cols., 2007; Bessoff y cols., 2008), sin embargo, la sensibilidad de la misma no ha sido reportada en la población mexicana, por lo que en 2010 se realizó un estudio en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud, en el que se calculó la sensibilidad de Platelia Dengue NS1 Ag en muestras de pacientes del Estado de Veracruz.

Para el estudio antes mencionado se procesaron 605 muestras de fase aguda y convaleciente de dengue, correspondientes a brotes epidémicos de los años 2007, 2008 y 2009 y con diagnóstico confirmatorio por cultivo y aislamiento viral e inmunofluorescencia o por detección de anticuerpos IgM por ELISA. A todas las muestras se les realizó la detección de sNS1 por ELISA con el equipo antes mencionado y para facilitar la evaluación, las muestras fueron clasificadas de acuerdo al tiempo transcurrido desde el inicio de la fiebre (tabla 3). Para la fase aguda, la sensibilidad del equipo fue de 97% (IC= 95%: 93,6%-98,9%) (Ruiz, 2010).

Tabla 3. Sensibilidad de Platelia Dengue NS1 Ag en función de la evolución de la enfermedad en pacientes mexicanos infectados por DENV (Ruiz-Tovar, 2010).

Fase	Evolución de la enfermedad (días)	Total de muestras	Platelia Dengue NS1 Ag		
			Muestras positivas	Sensibilidad (%)	95% IC
Aguda	0	18	18	100	81.5-100
	1	46	45	97.8	88.5-99.9
	2	45	44	97.8	88.2-99.9
	3	36	34	94.4	81.3-99.3
	4	33	32	97	84.2-99.9
	5	23	22	95.6	78-99.9
	Total	201	195	97.01	93.6-98.9
Convaleciente Temprana	6	31	18	58.1	39.1-75.4
	7	38	24	63.2	46-78.2
	8	34	14	41.2	24.6-59.3
	9	27	17	63	42.4-80.6
	10	34	13	38.2	22.2-56.4
	Total	164	86	52.44	44.5-60.3
Convaleciente Tardía	11	29	9	31	15.3-50.8
	12	33	6	18.2	7-35.5
	13	28	13	46.4	27.5-66.1
	14	26	7	26.9	11.6-47.8
	15	20	2	10	1.2-31.7
	16	24	3	12.5	2.7-32.4
	17	18	4	22.2	6.4-47.6
	18	11	0	0	0-28.5
	19	9	0	0	0-33.6
	20	7	1	14.3	0.36-57.9
	21	17	2	11.8	1.5-36.4
	≥22	18	0	0	0-18.5
	Total	240	47	19.58	14.8-25.2

2.4 Mutación en virus de RNA

Se estima que durante un ciclo de replicación de virus de RNA, hay una tasa de mutación de entre 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones de nucleótidos, por lo que la probabilidad de que ocurran mutaciones aumenta con la longitud de la cadena viral y el número de ciclos de replicación (Domingo y Holland, 1997; Kurosu, 2011). Dado que los genomas de virus de RNA tienen un tamaño de entre 3 y 32 Kb, en promedio se espera que ocurran entre 0,1 y 10 sustituciones por genoma y

ciclo de replicación (Domingo y Holland, 1997; Ayllón, 2006; Ojosnegros, 2008), por lo que los errores ocurridos constituyen un mecanismo evolutivo que proporciona a los virus la capacidad de subsistir en un medio continuamente cambiante (Domingo y Holland, 1997; Holmes, 2009). Ésta capacidad adaptativa genera cambios de la secuencia de aminoácidos en las proteínas virales que correlacionan con la evasión de la respuesta inmunológica, con la evasión a agentes antivirales, con alteraciones del tropismo celular (capacidad de reconocer receptores alternativos), y con alteración de la virulencia, así como con la aparición de enfermedades emergentes o re emergentes (Ayllón, 2006; Ojosnegros, 2008; Holmes, 2009).

2.5 Predicción de epítomos

Las mutaciones que generan cambios en la secuencia de aminoácidos modifican la estructura de las proteínas por lo que la comparación entre proteínas nativas y mutadas es de crucial importancia para entender las alteraciones en el reconocimiento de receptores y componentes del sistema inmunológico como los anticuerpos, etc. Se han desarrollado diversos métodos para la predicción de epítomos lineales y conformacionales los cuales suelen tener una precisión mayor al 75%, permitiendo la predicción de determinantes antigénicos en un periodo corto de tiempo y evitando la manipulación de material infeccioso (Bremo y Gonzatti, 2011). Los métodos más simples para predecir epítomos continuos parten de la secuencia de aminoácidos, mientras que los más finos consideran en su análisis la estructura tridimensional de la proteína obtenida por el análisis de su forma cristalizada o por modelaje computacional, requisito indispensable para la predicción de epítomos conformacionales (<http://tools.immuneepitope.org>). Para cualquiera de los métodos aplicados, se considera que un péptido debe tener un tamaño entre 8 y 20 aminoácidos, donde cada uno es evaluado individualmente y en conjunto con las posiciones cercanas según los parámetros que considera el método elegido. Entre los parámetros más evaluados para la predicción de determinantes antigénicos se encuentran la hidrofiliidad e hidrofobicidad,

flexibilidad, accesibilidad, formación de giros, superficie expuesta y polaridad, los cuales pueden ser calculados e interpretados entre sí o en comparación con epítomos confirmados experimentalmente (Calvo y cols., 2003; Bremo y Gonzatti, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha propuesto que la sensibilidad del ELISA para la detección de la proteína NS1 viral en casos de dengue depende de factores virales (serotipo infectante) y del hospedero (presencia de anticuerpos que impiden su detección mediante técnicas inmunológicas) los cuales al generar resultados negativos en esta prueba ocasionan la subestimación del número de casos. Por lo anterior, en este trabajo se analizará la secuencia de la proteína NS1 viral en busca de mutaciones que puedan relacionarse con el resultado del ELISA y expliquen la sensibilidad de dicha técnica en la población en estudio.

4. HIPÓTESIS

Las mutaciones que modifican la secuencia de aminoácidos en la proteína NS1 viral, restringen su reconocimiento por los anticuerpos utilizados en el ELISA comercial empleado para su detección en el diagnóstico de dengue.

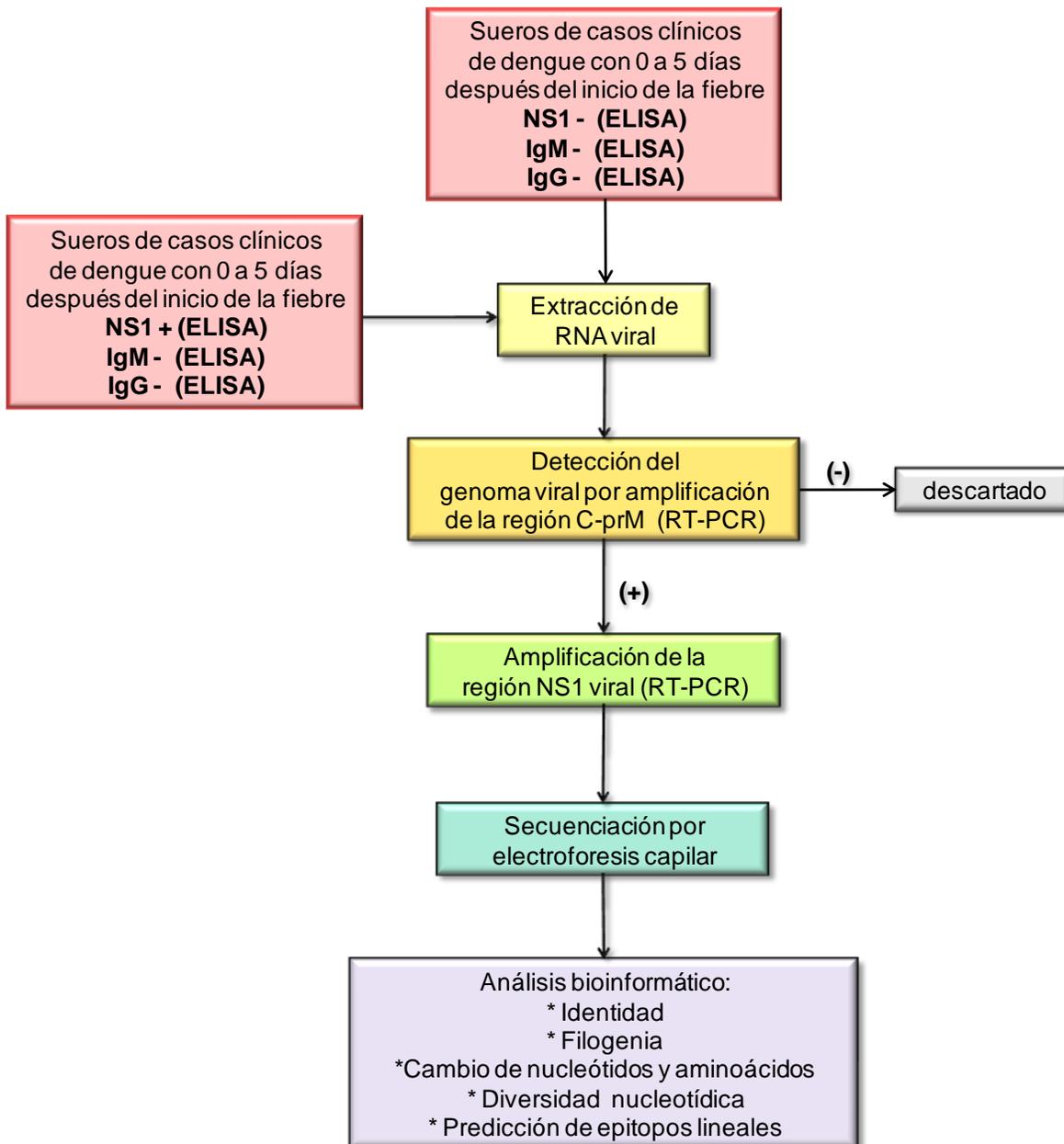
5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la secuencia de la región NS1 del genoma viral a partir de muestras de suero casos de dengue con resultado negativo a la detección de la proteína sNS1 por ELISA para establecer comparación con secuencias positivas a la misma prueba.

5.1 Objetivos particulares

- ♦ Estandarizar el procedimiento de amplificación de la región del genoma del DENV que codifica para la proteína NS1.
- ♦ Amplificar y secuenciar la región codificante de NS1 viral en muestras de casos de dengue con resultado positivo y negativo en el ELISA para la detección de la proteína.
- ♦ Relacionar la secuencia de la proteína NS1 del DENV con el resultado de su detección por ELISA.
- ♦ Realizar la predicción de epítomos lineales para proteína NS1 y determinar si las mutaciones presentes en las secuencias negativas al ELISA los afectan.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestras biológicas

Se emplearon muestras de suero de casos sospechosos de dengue, obtenidos dentro de los primeros 5 días de la infección, con resultado positivo (n=20) o negativo (n=172) a la detección del antígeno viral NS1 por ELISA y negativo a la detección de anticuerpos específicos de tipo IgG e IgM por la misma técnica, sin hemólisis, sin contaminación, no lipémicos y correspondientes al brote epidemiológico del año 2010 en el Estado de Veracruz, las cuales se clasificaron en dos grupos:

- Grupo 1: NS1, IgM e IgG negativos.
- Grupo 2: NS1 positivo e IgM e IgG negativos.

Las muestras NS1 positivas, se seleccionaron con base en el resultado de caracterización viral por aislamiento e inmunofluorescencia (DENV-1 n=10, DENV-2 n=10). Todas las muestras fueron donadas por la Sección de Virología del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) de Veracruz.

7.2 Purificación de RNA viral

La purificación del RNA viral se realizó a partir de suero y de sobrenadante de cultivo celular (en el caso de las cepas prototipo) y se utilizó el método de purificación por afinidad en columna, con el equipo comercial QIAamp® Viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 560 µL del buffer AVL y 5.6 µL de acarreador de muestra. Posteriormente, se adicionaron 140 µL de la muestra (suero o sobrenadante) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron 560 µL de etanol al 96-100% y se mezcló en vórtex por 15 segundos. Se adicionaron 630 µL de la mezcla anterior a una minicolumna con tubo colector y se centrifugó a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C, la mezcla restante de la mezcla se procesó de la misma forma y en la misma columna. La columna se

lavó con 500 µL del buffer AW1, centrifugando a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C y cambiando el tubo colector y después con 500 µL del buffer AW2, centrifugando a 14,000 xg por 3 minutos a 4°C cambiando el tubo colector nuevamente. Para la elusión, la columna se colocó dentro de un micro tubo de 1.5mL libre de RNAasas y se adicionaron 60 µL del buffer AVE dentro de esta. El sistema se centrifugó a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C. El producto eluido (RNA viral) fue empleado inmediatamente o almacenado a -70°C hasta su uso.

7.3 Detección del genoma viral en suero

La detección del genoma viral en el suero de los pacientes se llevó a cabo por RT-PCR, utilizando el método descrito por Lanciotti en 1992 y modificado por Chien y cols. en 2006 y que consiste en la amplificación de la región C-prM del genoma del DENV. Los iniciadores empleados fueron: sentido (mD1) TCAATATGCTGAAACG CGAGAGAAACCG; antisentido (D2) TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC (figura 9).

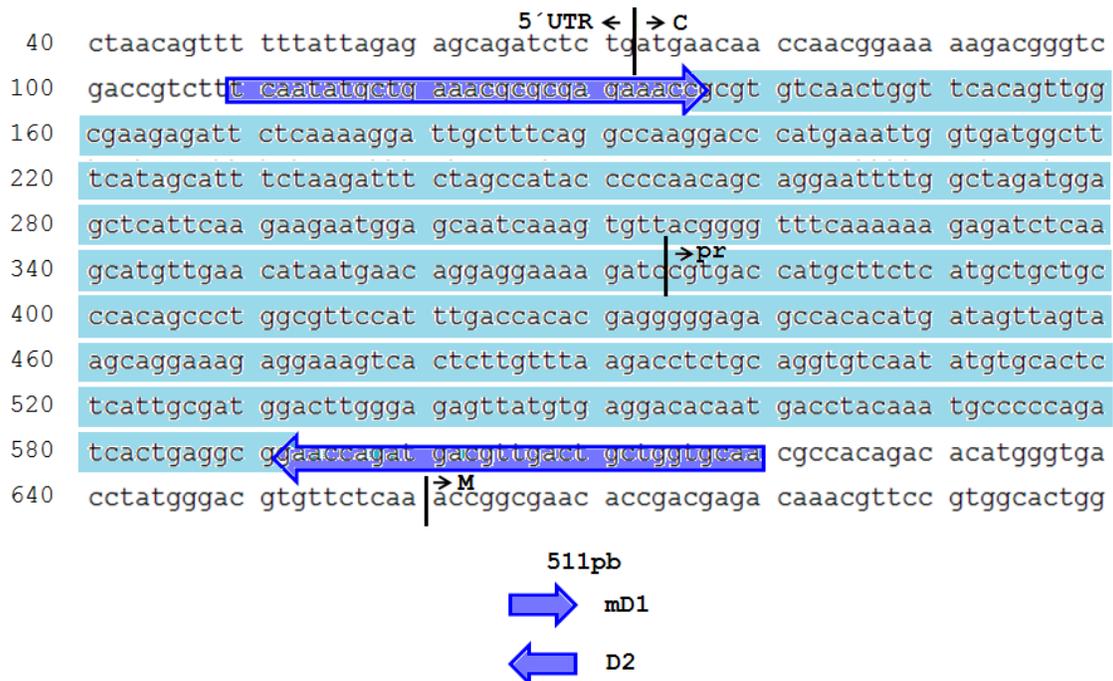


Fig. 9. Cobertura de amplificación de la región C-prM del genoma del DENV descrita por Chien y cols., 2006.

La amplificación se realizó con el equipo comercial One Step RT-PCR Kit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante y realizando la siguiente mezcla de reacción en micro tubos de 200 μ L para PCR:

Reactivos One Step RT-PCR (QIAGEN)	Volumen (μ L)
Buffer 5x	5.0
dNTP Mix	1.0
Enzyme Mix	1.0
mD1 10pmol/ μ L	1.0
D2 10pmol/ μ L	1.0
RNA viral	13.0

La reacción se llevó a cabo en un termociclador de punto final ATC401 (Apollo Instrumentations, USA) bajo las siguientes condiciones de tiempo y temperatura:

	Fase	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo
	RT	50	40 min
	Inactiv. RT / Activ. Taq	95	15 min
40 Ciclos	Desnaturalización	94	30 seg
	Alineación	58	1 min
	Extensión	72	1 min
	Extensión final	72	10 min
	Enfriamiento	4	5 min

RT: Retro-transcripción; Taq: enzima Taq polimerasa

Los amplicones obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y utilizando como referencia un marcador de peso molecular para DNA de 100 pb (PROMEGA, USA). Los geles fueron revelados con el equipo Kodak Digital Science 1D Versión 2.0.2 (Kodak, USA) para la identificación de un producto de 511pb correspondiente a la región

de interés. Como control positivo se utilizó el RNA de las cepas prototipo ATCC de DENV-1 Hawaii y DENV-2 Nueva Guinea.

7.4 Amplificación de la región NS1 viral

Aquellas muestras con resultado positivo y negativo a la detección de NS1 por ELISA y con resultado positivo a la detección del genoma viral por amplificación de la región C-prM, se procesaron para la amplificación de la región codificante de NS1 viral de los serotipos 1 y 2 del DENV por RT-PCR. Para ello se diseñaron 2 juegos de iniciadores serotipo-específicos con la finalidad de cubrir la totalidad de la región NS1, debido a que estos fueron los únicos serotipos circulantes en Veracruz durante 2010:

Primer	Tamaño	Secuencia y localización genómica	Tamaño del amplicón
DV1F1	23b	2406-ATGTGTAATCAACTGGAAGGGCA	576pb
DV1R1	22b	TCCTTGATGGCAGCTGACATTA- 2945	
DV1F2	26b	2863-GAGGACTATGGGTTTGGAATTTTCAC	561pb
DV1R2	29b	CCTAACTAGATTCTCCTCCTTCTCCTTTA- 3410	
DV2F1	26b	2400-GATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAA	630pb
DV2R1	30b	CCATGTGTCATTGAGTGCACTTTCTATCCA- 3000	
DV2F2	33b	2924-GGATGTATTTTGTGACTCAAACTCATGTCAGC	505pb
DV2R2	33b	CTCTTCTTTCTCTTTCAATGGTCTGATTTCCAT- 3396	

DV1: DENV-1; DV2: DENV-2; F: *Forward* (sentido); R: *Reverse* (anti-sentido)

El diseño de los iniciadores se realizó con el programa bioinformático Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®, Coralville, USA) y las amplificaciones se llevaron a cabo con el equipo comercial One Step RT-PCR Kit (QIAGEN), preparando las mezclas de reacción en micro tubos de 200 µL libres de RNAsas, de acuerdo a las indicaciones del fabricante:

Reactivos One Step RT-PCR (QIAGEN)	Volumen (μL)
Buffer 5x	5.0
dNTP Mix	1.0
Enzyme Mix	1.0
Iniciador F 10pmol/μL	1.0
Iniciador R 10pmol/μL	1.0
RNA viral	13.0

La reacción se realizó en el termociclador de punto final TC050-18 (Labnet, USA) siguiendo las condiciones de tiempo y temperatura que se muestran a continuación, las cuales se definieron utilizando el RNA de las cepas prototipo de DENV-1 y DENV-2:

	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
	RT	50	40 min
	Inactiv. RT / Activ. Taq	95	15 min
40 Ciclos	Desnaturalización	94	30 seg
	Alineación	55 (DENV-1) 60 (DENV-2)	1 min
	Extensión	72	1 min
	Extensión final	72	10 min
	Enfriamiento	4	5 min

Los productos de PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Para la región codificante de NS1 del serotipo 1 de DENV se obtuvieron productos de 576 y 561 pb, mientras que para el serotipo 2 de 630 y 505 pb.

7.4.1 Purificación de amplicones

Los amplicones de la región NS1 viral fueron purificados mediante el sistema de electroforesis E-Gel® Size Select™ en geles de agarosa al 2% (Invitrogen, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El gel consta de dos filas de pocillos, la primera de ellas para cargar la muestra “impura” (pocillos primarios) y la segunda para recuperar el producto de interés con base en su peso molecular (pocillos secundarios). En los pocillos primarios se colocaron 20µL del amplicón y 20 µL de agua grado PCR en los pocillos secundarios. Se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (PROMEGA) en el pozo M. La corrida se realizó con el programa específico incluido en el equipo (E-Gel® iBase™ Power System, Invitrogen) y la presencia del o los productos se hizo evidente mediante agentes intercalantes de DNA presentes en el gel. En el momento que los amplicones de interés corrieron y se depositaron en los pocillos secundarios, la corrida se detuvo y se recuperaron los productos con ayuda de una micropipeta (figura 10). La pureza de los productos se corroboró en un gel de agarosa al 2%.

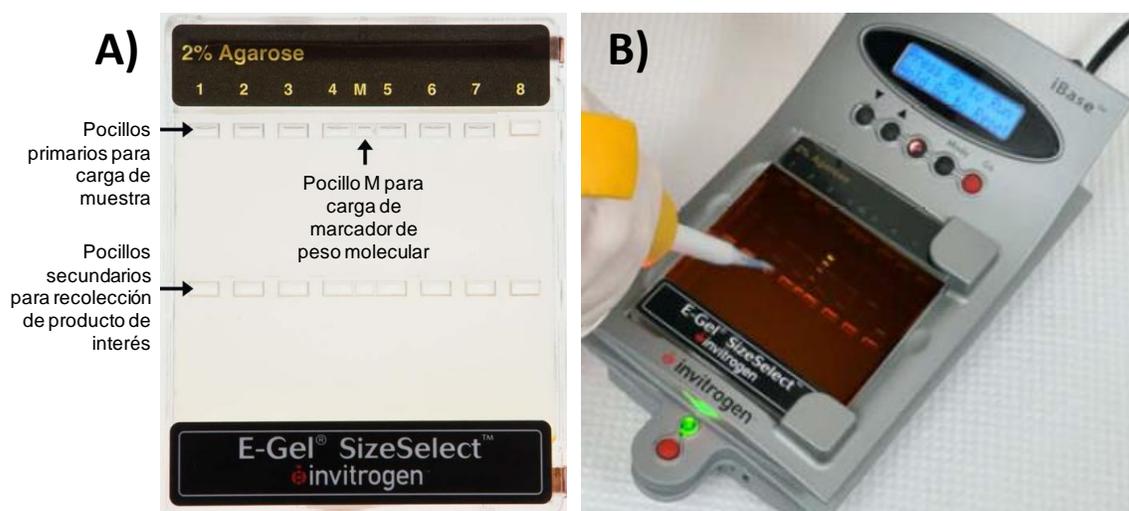


Figura 10. (A) Formato del sistema comercial E-Gel SizeSelect y (B) cámara horizontal para la purificación de amplicones por electroforesis en agarosa al 2%(Invitrogen, 2008).

Finalmente, los productos purificados se analizaron y cuantificaron por espectrofotometría con el equipo Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek®, San Francisco CA, USA). Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm y se obtuvo la relación 260/280 para verificar la pureza correspondiente (óptima de 1.5-2.0).

7.6 Secuenciación

Una vez que se obtuvieron los amplicones puros, se procedió a la secuenciación de los mismos por electroforesis capilar en el equipo AB 3730 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA) con el equipo comercial Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y este procedimiento se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.7 Análisis bioinformático

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación fueron editados con el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor versión 7.1.11 (Ibis Biosciences, CA, USA). Una vez editadas y ensambladas por completo, las secuencias de la región NS1 del DENV fueron analizadas para comprobar su identidad mediante la herramienta *Nucleotide BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ya que la identidad de las secuencias NS1 de los grupos en estudio fue verificada, se realizó un alineamiento múltiple de éstas con todas las secuencias de referencia de aislados mexicanos de DENV-2 publicadas en el Gen Bank (NCBI) para construir su árbol filogenético según el método de “el vecino más cercano” (del inglés *Neighbor-Joining*) verificando la topología de las ramas con 500 repeticiones (*bootstraps*). La distancia evolutiva fue calculada usando el método de “Kimura” mediante el programa bioinformático MEGA versión 5.0 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics–Biodesign Institute, Tempe, USA). El mismo alineamiento múltiple descrito anteriormente, sirvió para la búsqueda de cambios nucleotídicos entre los

grupos 1 (NS1 negativo) y 2 (NS1 positivo) que pudieran asociarse con la negatividad de la proteína por ELISA.

Una vez que se identificaron tanto cambios nucleotídicos como aminoacídicos en las secuencias en estudio, se procedió a realizar el análisis de diversidad genética de la región NS1 del DENV-2. Para ello, las secuencias del grupo 1 (NS1 negativo) fueron clasificadas como conjunto 1, las del grupo 2 (NS1 positivo) como conjunto 2 y las secuencias de referencia NS1 DENV-2 del Gen Bank (1983-2008) como conjunto 3. Cada uno de estos conjuntos fue analizado por separado en el programa bioinformático Dna SP versión 5.10.01 (Rozas, J. y cols., Universidad de Barcelona), para calcular el *número de cambios nucleotídicos* (S), dividiendo este resultado entre la longitud de las secuencias (1029 nucleótidos) y obtener la *media de diversidad*. Debido a que los conjuntos analizados agruparon un número diferente de secuencias, se calculó el estimador Theta de Watterson (θ); $\theta=K/a_n$; donde K es el total de sitios que difieren entre secuencias (S) y a_n es $1+1/2+\dots+ 1/n-1$ (n = número de secuencias), que estima la diversidad genética tomando en cuenta los cambios de mayor y menor frecuencia en una población así como su tamaño (n). Después de calcular el valor promedio del estimador θ , este fue calculado para cada posición nucleotídica de los tres conjuntos en busca de regiones con diferencias en diversidad genética.

Finalmente, a partir de las secuencias nucleotídicas se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1 (342 residuos) y se analizaron con el programa Predicted Antigenic Peptides (Reche, P. y cols., Universidad Complutense de Madrid, disponible en <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) para identificar si las posiciones aminoacídicas con cambios fenotípicos encontrados exclusivamente en las secuencias NS1 negativas al ELISA participan en epítomos lineales, y si existe alteración de estos al ocurrir la sustitución de aminoácido. La predicción de determinantes antigénicos se realizó según el método de Kolaskar y Tongaonkar que considera hidrofiliidad (P_h), accesibilidad (P_a) y flexibilidad (P_f) calculando un *valor de propensión antigénica* (A_p) en octapéptidos con base en

epítomos confirmados experimentalmente, donde residuos de más de 8 aminoácidos con un valor de A_p mayor a 1.0 se consideran epítomos lineales (Kolaskar y Tongaonkar, 1990).

8. RESULTADOS

8.1 Detección del genoma viral por RT-PCR

Para confirmar la presencia del genoma viral en las muestras seleccionadas, se procedió a la amplificación de la región C-prM del mismo, que es homóloga entre los cuatro serotipos del DENV. Se utilizó una RT-PCR de un solo paso basada en el procedimiento propuesto por Chien y cols. en 2006, obteniendo un producto de 511 pb (figura 11). El genoma del DENV solo se detectó en 9 (5%) de las 172 muestras del grupo 1 (NS1-) y para el grupo 2 (NS1+), este se detectó en el 100% de las muestras (figura 12).

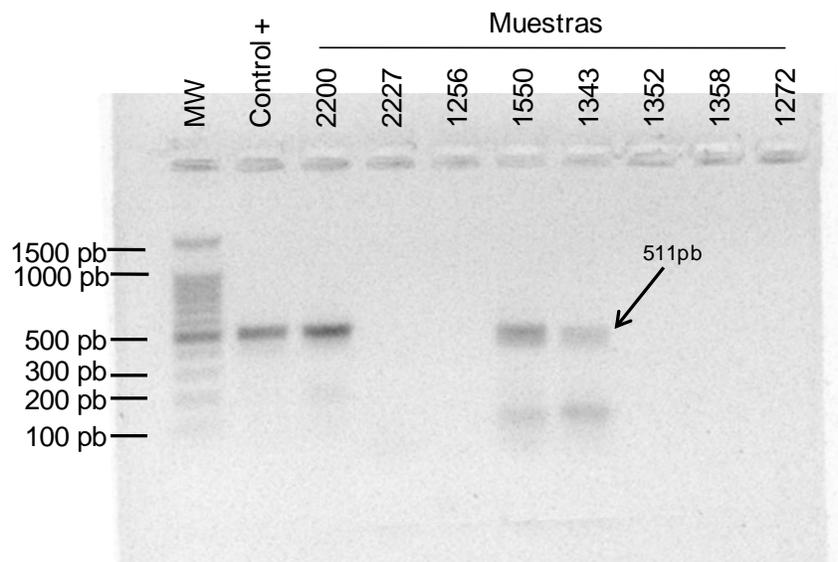


Fig. 11. Amplificación de la región C-prM del genoma del DENV (511 pb) en muestras de suero de casos sospechosos. (Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular; Control +: cepa prototipo de DENV-1).

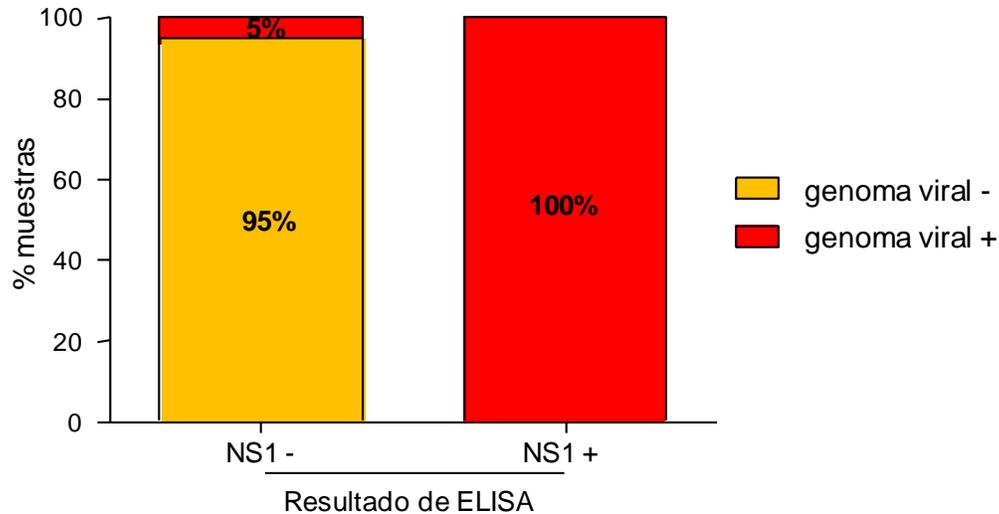


Fig. 12. Muestras RT-PCR + con resultado positivo y negativo a la detección de NS1 del DENV por ELISA en casos de dengue.

8.2 Secuenciación de la región NS1 del DENV

Una vez que se identificó la presencia del genoma viral en las muestras, se procedió a la amplificación de la región codificante de NS1 del DENV por RT-PCR, con los dos juegos de iniciadores diseñados para los serotipos 1 y 2 los cuales cubrieron la región NS1 (1056 nucleótidos) y se traslaparon en un punto intermedio de la secuencia permitiendo analizarla por completo (figuras 13 y 14). La hibridación específica de los iniciadores con la región codificante de la proteína NS1 de DENV, fue corroborada por alineación con secuencias de aislados virales mexicanos de reciente publicación en el NCBI, resultando complementarios al 100%.

Una vez estandarizado el procedimiento de amplificación de la región NS1 viral de los serotipos 1 y 2 del DENV, se inició la amplificación de dicha región a partir del RNA viral obtenido de las 9 muestras del grupo 1 (NS1-), las cuales se procesaron con los iniciadores para ambos serotipos del virus y los resultados indicaron que 7 fueron positivas a DENV-2 (figura 15) y las 2 restantes fueron negativas para ambos serotipos virales.

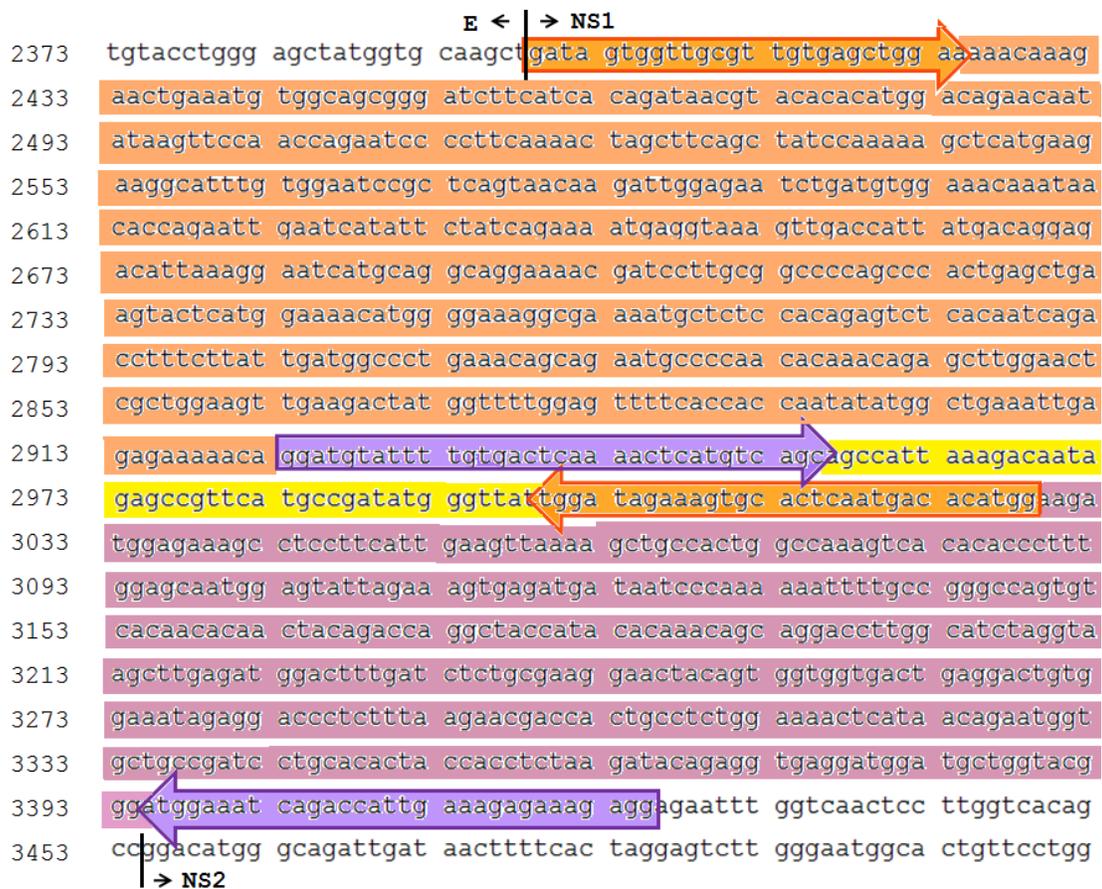


Fig. 14. Cobertura de amplificación de la región NS1 del genoma del DENV-2. (Flechas anaranjadas: Fragmento 1; Flechas moradas: Fragmento 2; zona amarilla: región de traslape)

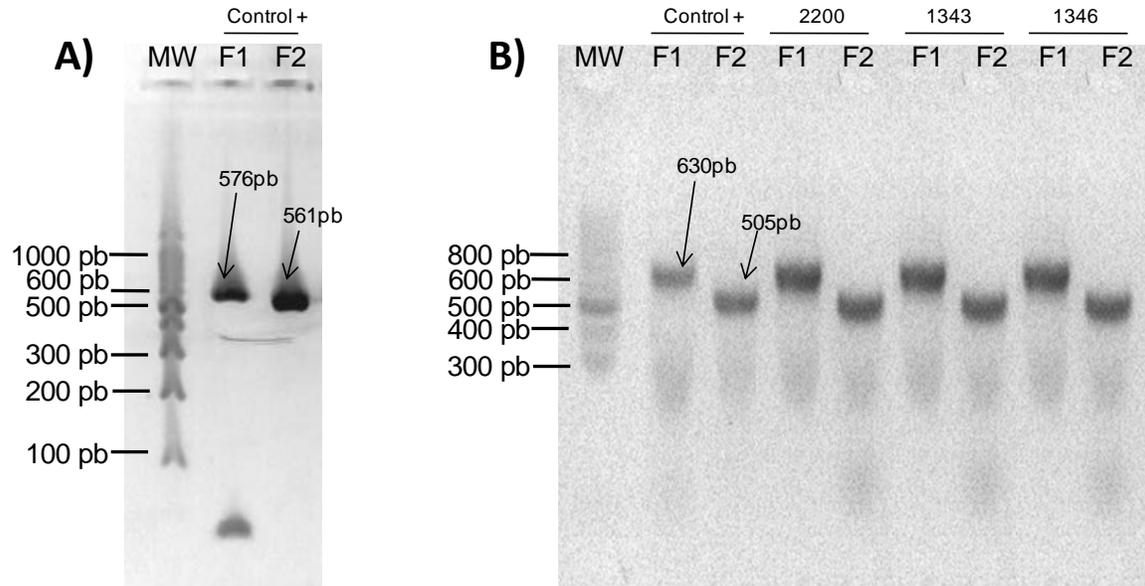


Fig. 15. (A) Amplificación de la región codificante de NS1 del DENV-1 y (B) del DENV-2 a partir de muestras de suero de casos sospechosos (Grupo 1: NS1 negativo). (Los productos se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular; Control +: control positivo de DENV-1 y DENV-2; F1: fragmento 1; F2: fragmento 2.)

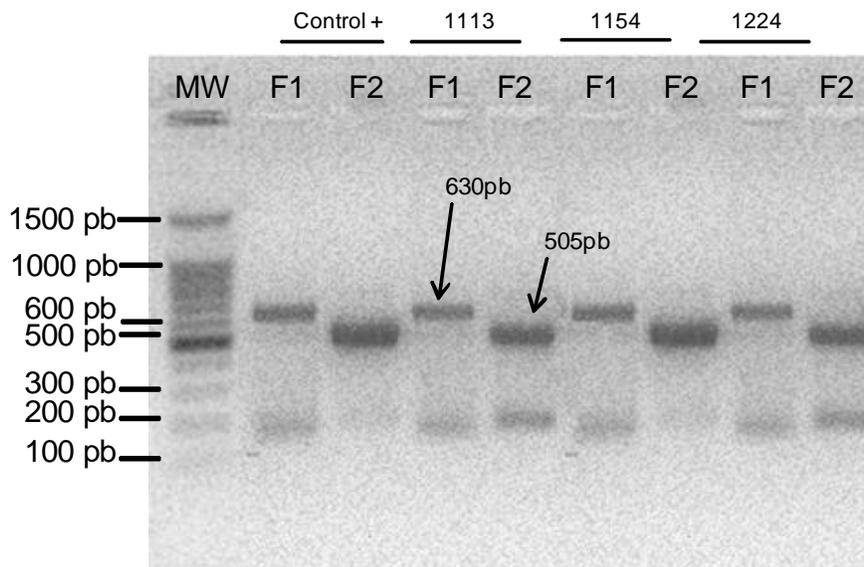


Fig. 16. Amplificación de la región codificante de NS1 del DENV-2 a partir de muestras de suero de casos confirmados (Grupo 2: NS1 positivo). (Los productos se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% teñiendo con bromuro de etidio. MW: marcador de peso molecular; Control +: control positivo de DENV-2; F1: fragmento 1; F2: fragmento 2.)

Ya que se contaba con los productos específicos de NS1 de las muestras de ambos grupos, se procedió a su purificación por electroforesis en geles de agarosa al 2% y selección del producto por peso molecular (sistema E-Gel® Size Select™) para la eliminación de dímeros de iniciadores y de productos inespecíficos. Posteriormente se verificó la pureza de los amplicones en geles de agarosa al 2% y por espectrofotometría a 260 y 280 nm (figura 17 y tabla 4). Dichos productos se secuenciaron por electroforesis capilar y los electroferogramas obtenidos (figura 18) se editaron con el programa Bio Edit para eliminar lecturas erróneas. Las secuencias de los fragmentos 1 y 2 obtenidos de cada muestra, fueron procesados y fusionados para generar la secuencia completa de la región NS1 del genoma viral.

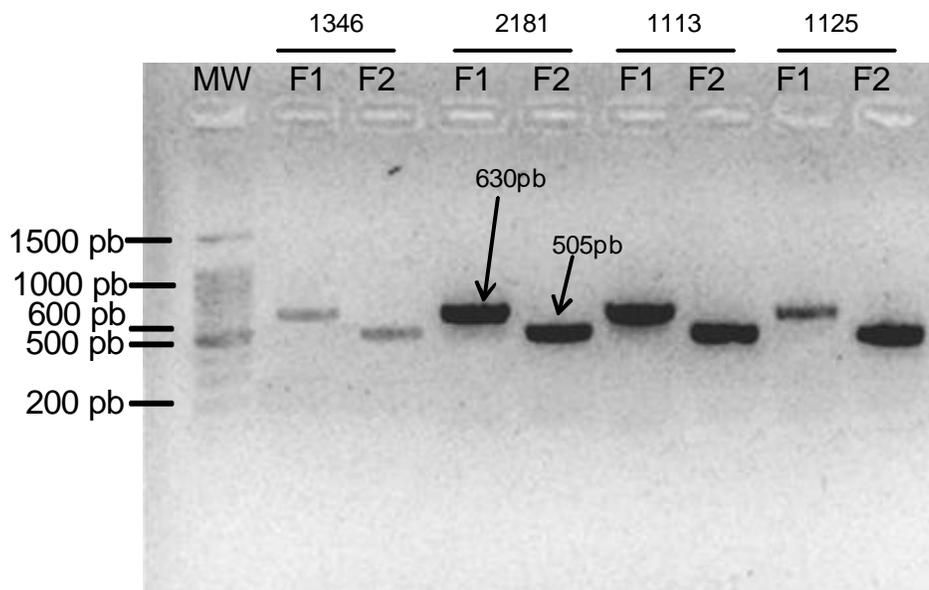


Fig. 17. Gel representativo que corrobora la purificación de los productos de amplificación de la región NS1 de muestras negativas (1346 y 2181) y positivas (1113 y 1125) a la proteína NS1 por ELISA. (MW: marcador de peso molecular; F1: fragmento 1; F2: fragmento 2.)

Tabla 4. Verificación de la pureza de los amplicones de NS1 viral por espectrofotometría. (El valor aceptable de la relación 260/280 (nm) es 1.5-2.0. F1: fragmento 1; F2: fragmento 2.)

	Muestra	Relación 260/280
Grupo 1 (NS1 negativo)	0171-F1	1.758
	0171-F2	1.755
	0172-F1	1.718
	0172-F2	1.724
	1343-F1	1.739
	1343-F2	1.736
	1346-F1	1.735
	1346-F2	1.735
	1550-F1	1.737
	1550-F2	1.739
	2181-F1	1.737
	2181-F2	1.737
	2200-F1	1.74
	2200-F2	1.762
Grupo 1 (NS1 positivo)	1113-F1	1.703
	1113-F2	1.7
	1125-F1	1.711
	1125-F2	1.731
	1153-F1	1.72
	1153-F2	1.726
	1154-F1	1.73
	1154-F2	1.715
	1162-F1	1.719
	1162-F2	1.715
	1224-F1	1.721
	1224-F2	1.731
	1225-F1	1.707
	1225-F2	1.71
	1556-F1	1.734
	1556-F2	1.735
1704-F1	1.736	
1704-F2	1.738	

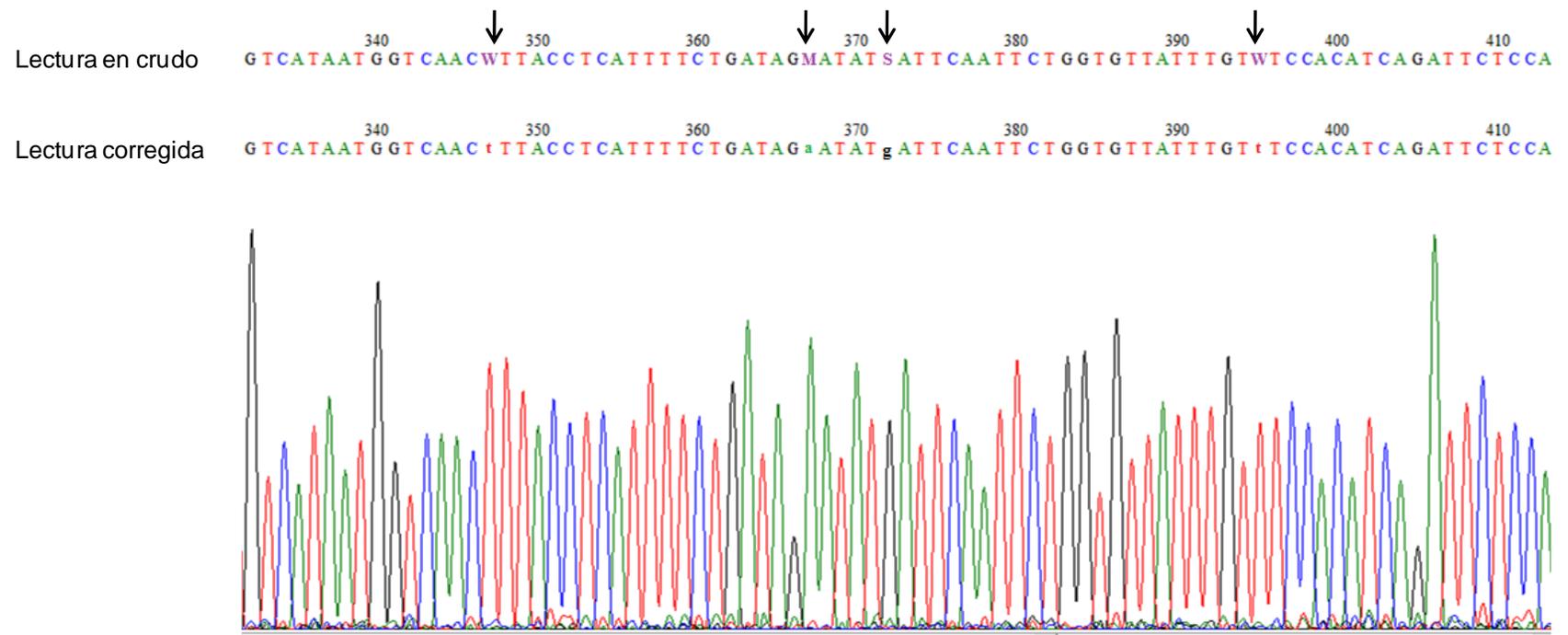


Fig. 18. Electroferograma de secuenciación capilar de la región NS1 viral del DENV-2 en casos negativos a NS1 por ELISA (Grupo 1). (Las flechas indican las posiciones donde se realizaron correcciones a la lectura.)

Las secuencias completas de la región NS1 tanto del grupo 1 como del grupo 2 se conformaron por 1029 nucleótidos que presentaron en todos los casos el 99% de identidad con secuencias de DENV-2, muchas de ellas procedentes de aislados virales mexicanos (figura 19).

BLAST® Basic Local Alignment Search

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Registered]

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - JUD2PRJ401R

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

2200 NS1- secuencia final

Query ID	Id 48575	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.27+ Citation
Query Length	1029		

	Description	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3654/2006, complete genome	99%	GQ868497.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3661/2006, complete genome	99%	GU131959.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3768/2004, complete genome	99%	GU131955.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V2683/1999, complete genome	99%	GQ199895.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V2924/2000, complete genome	99%	FJ898478.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V2664/2000, complete genome	99%	FJ850065.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3715/2007, complete genome	99%	GU131974.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3714/2007, complete genome	99%	GQ868516.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V518/2005, complete genome	99%	GQ868604.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3763/2008, complete genome	99%	JN819422.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V2661/2000, complete genome	99%	JN819416.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V4644/2005, partial genome	99%	HQ541801.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V3713/2007, complete genome	99%	GQ868515.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/MX/BID-V2954/2002, complete genome	99%	GQ199893.1
<input type="checkbox"/>	Denque virus 2 isolate DENV-2/NI/BID-V3076/2001, complete genome	99%	GQ199898.1

Fig. 19. Análisis de identidad de secuencias NS1 de DENV-2 de muestras negativas a la proteína NS1 por inmunoensayo.(Se muestra el nombre y número de acceso del Gen Bank (NCBI) de las secuencias con las que secuencia problema presenta máxima identidad.)

Al realizarse un alineamiento múltiple de las secuencias NS1 negativas (grupo 1) y positivas (grupo 2) con las secuencias mexicanas de referencia de DENV-2 (tabla 5) sumando un total de 31, las secuencias en estudio mostraron un porcentaje de cobertura del 97% con respecto a las de referencia. El árbol generado por la reconstrucción filogenética, mostró que todas las secuencias analizadas se encontraron incluidas en la raíz del mismo, donde se distinguieron dos ramas, la primera de ellas agrupó las secuencias de referencia correspondientes a las décadas de los años 1980 y 1990, mientras que en la segunda se concentraron las posteriores a 2002, incluyendo nuestros grupos de estudio, formando entre ellas grupos definidos (figura 20).

Tabla 5. Aislados mexicanos de DENV-2 publicados en el Gen Bank

Aislado	Lugar de muestreo	Acceso GenBank
DENV-2/MX/BID-V3354/1983	---	GQ868588.1
DENV-2/MX/BID-V3355/1983	---	GQ868589.1
DENV-2/MX/BID-V3356/1992	Sonora	GQ868590.1
DENV-2/MX/BID-V2953/2002	Nayarit	FJ898438.1
DENV-2/MX/BID-V2954/2002	Oaxaca	GQ199893.1
DENV-2/MX/BID-V3768/2004	Quintana Roo	GU131955.1
DENV-2/MX/BID-V2959/2005	Hidalgo	GQ199894.1
DENV-2/MX/BID-V3654/2006	Yucatán	GQ868497.1
DENV-2/MX/BID-V3661/2006	Yucatán	GU131959.1
DENV-2/MX/BID-V3713/2007	Yucatán	GQ868515.1
DENV-2/MX/BID-V3714/2007	Yucatán	GQ868516.1
DENV-2/MX/BID-V3715/2007	Yucatán	GU131974.1
DENV-2/MX/BID-V3717/2007	Yucatán	GU131975.1
DENV-2/MX/BID-V2964/2008	Chiapas	FJ898439.1
DENV-2/MX/BID-V3763/2008	Chiapas	JN819422.1

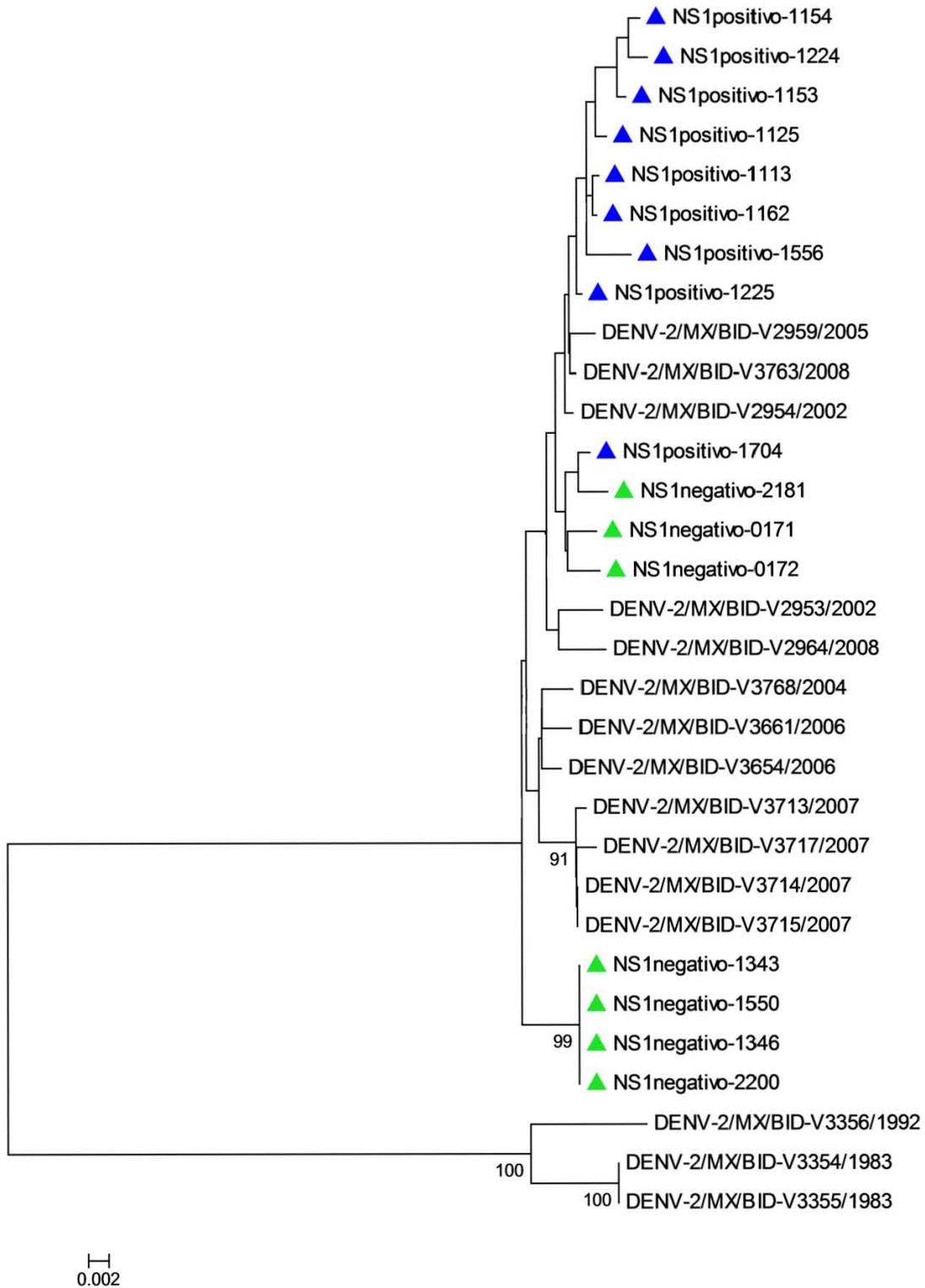


Fig. 20. Análisis filogenético (Neighbor-Joining) de la región NS1 viral de secuencias mexicanas de DENV-2. (Las muestras grupo 1 (NS1 negativo) se representan con triángulos verdes y las del grupo 2 (NS1 positivo) por triángulos azules.)

Una vez realizada la búsqueda de cambios nucleotídicos entre los grupos 1 (NS1 negativo) y 2 (NS1 positivo) que pudieran asociarse con la negatividad de la proteína por ELISA, se encontró que todos los cambios que exhiben las secuencias con resultado negativo al ELISA de NS1 (grupo 1), corresponden a sustituciones de nucleótidos, en su mayoría transiciones (purina→purina, pirimidina→pirimidina), sin embargo, también se hallaron cambios que resultan de la similitud de estas secuencias (grupo 1) con las de referencia de DENV-2 que fueron publicadas en el Gen Bank antes o durante 2008 (tabla 6). La frecuencia de las sustituciones nucleotídicas se encontró entre 1/7 y 5/7.

Al realizar el análisis comparativo de secuencia de aminoácidos, se observó una alta homogeneidad entre las secuencias del grupo 1 (NS1 negativo) y del grupo 2 (NS1 positivo), aunque cabe señalar que se observaron 2 cambios de aminoácidos en las secuencias del grupo 1 que pudieran asociarse al resultado negativo en el inmunoensayo, el primero de ellos en el aminoácido 112, con el cambio Lys→Arg y el otro en el aminoácido 217, con el cambio Phe→Leu.

De manera general, durante el análisis comparativo de composición nucleotídica se observaron regiones muy conservadas entre los grupos 1 (NS1 negativo) y 2 (NS1 positivo) y las secuencias de referencia 2002 a 2008, así como posiciones polimórficas cuando se analizan todos los grupos (NS1₆₃ C/T, NS1₅₅₈ G/A, NS1₆₄₅ T/C), que constituyen mutaciones silenciosas, es decir, no generan cambio de aminoácido. Este mismo análisis también reveló que existen 8 posiciones con cambio nucleotídico exclusivas de las secuencias del grupo 2 (NS1 positivo) (NS1₁₀₃ C→G, NS1₂₄₀ A→T, NS1₄₇₁ C→G, NS1₆₀₇ G→C, NS1₆₃₃ G→A, NS1₆₄₁ A→G, NS1₉₆₉ C→T, NS1₉₇₂ A→G), de las cuales la mitad genera cambio de aminoácido (NS1₃₅ Gln→Glu, NS1₁₅₇ Asp→Glu, NS1₂₀₃ Glu→Gln, NS1₂₁₂ Lys→Arg). En cuanto a las secuencias de referencia de los años 1989 y 1992, se observó que éstas difieren ampliamente del resto de las secuencias nucleotídicas analizadas, de manera tal que en el análisis de secuencia de aminoácidos, se identificaron 8 cambios (NS1₂₁ Ile→Val, NS1₉₉ Ala→Val,

NS1₁₂₈ Leu→Ser, NS1₁₇₀ Lys→Arg, NS1₂₁₂ Met→Ile, NS1₂₄₂ Ile→Val, NS1₂₅₆ Tyr→Asn, NS1₂₉₀ Asp→Glu) con respecto a las secuencias de referencia, NS1 negativo y NS1 positivo estudiadas.

Por otra parte, el análisis de diversidad genética de la región NS1 del DENV-2 mostró que la *media de diversidad* del conjunto 1 (NS1 negativo) y conjunto 2 (NS1 positivo) resultaron semejantes, pero numéricamente mucho menores comparando con el conjunto 3 (secuencias de referencia NS1 DENV-2 1983-2008) (tabla 7). Tomando en cuenta la diferencia de tamaños entre los conjuntos analizados y los cambios de mayor y menor frecuencia con el análisis de Watterson, pudo observarse nuevamente que la diversidad nucleotídica promedio de los conjuntos 1 y 2 es similar entre ellos y mucho menor a la que presenta el conjunto 3 (tabla 7).

Tabla 7. Diversidad genética de la región NS1 viral de muestras positivas y negativas al ELISA en casos de dengue.

	Conjunto 1 (NS1 negativo) n=7	Conjunto 2 (NS1 positivo) n=9	Conjunto 3 (Gen Bank) n=15
Cambios nucleotídicos por conjunto (S)	18	19	137
Media de diversidad	0.01749	0.01847	0.13314
Theta de Watterson (θ)	0.00714	0.00679	0.04125

Para el caso del cálculo del estimador θ por cada posición nucleotídica de los tres conjuntos estudiados, se encontró una región de mayor diversidad genética entre las posiciones 750 y 1000 del conjunto 1 (NS1 negativo) al compararlo con el conjunto 2 (NS1 positivo) (figura 21). Esta comparación también informó que la región 250 a 750 tiene un comportamiento de diversidad nucleotídica similar entre ambos conjuntos y que la región 0 a 250 es más diversa en el conjunto 2 (NS1 positivo).

Tabla 6. Cambios de nucleótido asociados con la negatividad del ELISA para detectar la proteína NS1 de

Secuencia	Posición nucleotídica en la región NS1													
	030	335	534	579	648	651	660	672	810	813	831	861	864	987
	C	A	T	C	C/T	C/T	T/C	C	A	T	T	G	T	C
Secuencias Gen Bank	DENV-2/MX/BID-V3354/1983	-	G	-	-	-	-	-	-	C	-	A	C	-
	DENV-2/MX/BID-V3355/1983	-	G	-	-	-	-	-	-	C	-	A	C	-
	DENV-2/MX/BID-V3356/1992	-	G	-	-	-	-	-	-	C	-	A	C	-
	DENV-2/MX/BID-V2953/2002	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V2954/2002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3768/2004	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V2959/2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3654/2006	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3661/2006	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3713/2007	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3714/2007	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3715/2007	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3717/2007	T	-	-	-	-	-	-	G	-	C	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V2964/2008	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DENV-2/MX/BID-V3763/2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	NS1 positivo - 1113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 positivo - 1704	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 1	NS1 negativo - 0171	-	-	-	-	A	G	G	-	-	-	-	-	-
	NS1 negativo - 0172	T	-	C	-	-	G	-	-	-	C	-	-	T
	NS1 negativo - 1343	T	-	-	-	-	-	-	T	G	C	C	A	C
	NS1 negativo - 1346	T	-	-	-	-	-	-	T	G	C	C	A	C
	NS1 negativo - 1550	T	-	-	-	-	-	-	T	G	C	C	A	C
	NS1 negativo - 2181	-	G	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS1 negativo - 2200	T	-	-	-	-	-	-	T	G	C	C	A	C

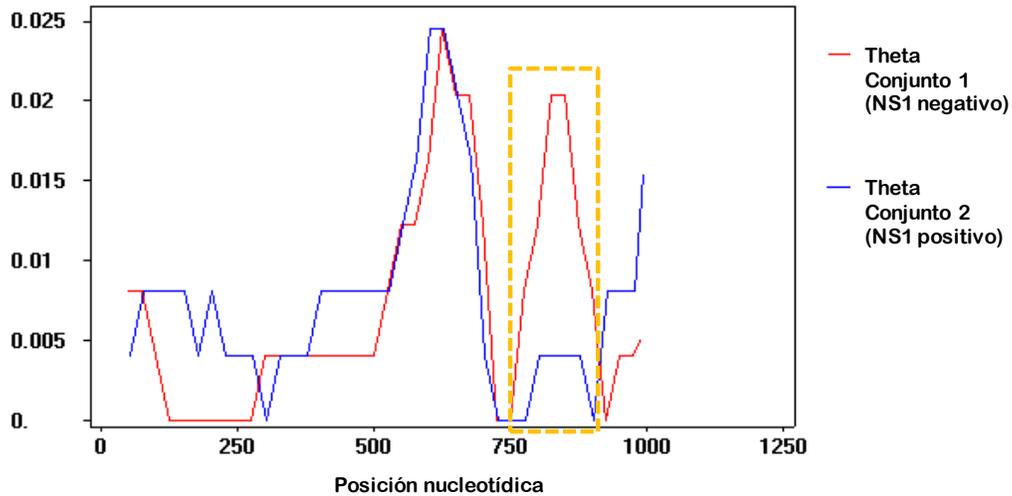


Fig. 21. Análisis de diversidad nucleotídica de la región NS1 de DENV-2 en secuencias negativas (conjunto 1) y positivas (conjunto 2) a la proteína NS1 por ELISA. (Las líneas punteadas enmarcan la zona en la que difieren los conjuntos.)

Al comparar los conjuntos 1 (NS1 negativo) y 3 (secuencias de referencia Gen Bank), se observó que el conjunto 3 exhibe mayor diversidad nucleotídica que el conjunto 1 en todas las posiciones, así que en este análisis no se puede delimitar una región de mayor diversidad nucleotídica exclusiva de las secuencias NS1 negativo (figura 22).

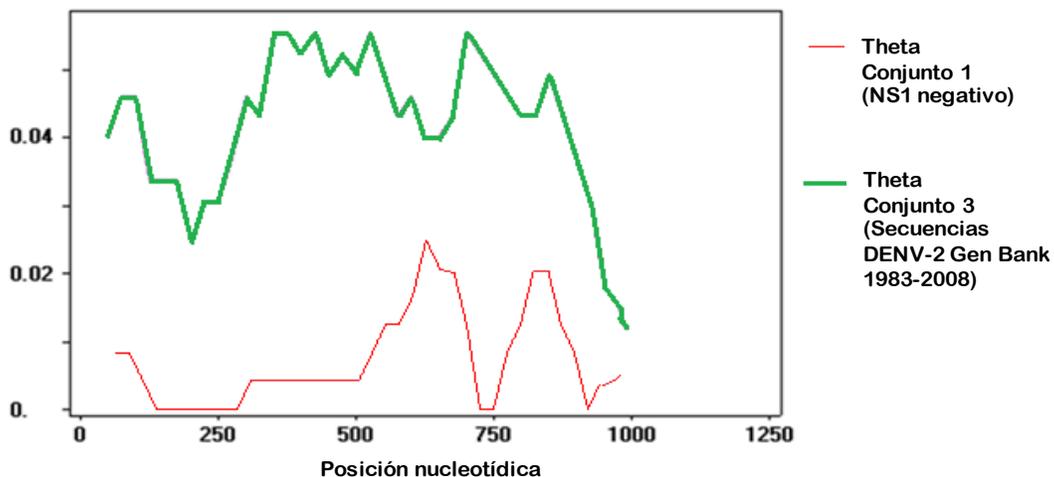


Fig. 22. Análisis de diversidad nucleotídica de la región NS1 de DENV-2 en secuencias NS1 negativas al ELISA (conjunto 1) y secuencias NS1 mexicanas de referencia del periodo 1983-2008 (NS1 positivo).

Finalmente, el análisis de predicción de epítomos lineales en una secuencia NS1 nativa (sin cambio de aminoácido: NS1₁₁₂ Lys y NS1₂₁₇ Phe) y modificada (incluye los aminoácidos sustitutos: NS1₁₁₂ Arg y NS1₂₁₇ Leu) según Kolaskar y Tongaonkar, mostró que existen 12 determinantes antigénicos para la secuencia nativa de NS1, en los que toman parte los aminoácidos 112 (Lys) y 217 (Phe). Para la secuencia NS1 modificada se obtuvo el mismo número de epítomos lineales donde el aminoácido 217 modificado (Leu) nuevamente se encontró incluido, pero no fue así para el residuo 112 modificado (Arg) (figura 23 y tabla 8).

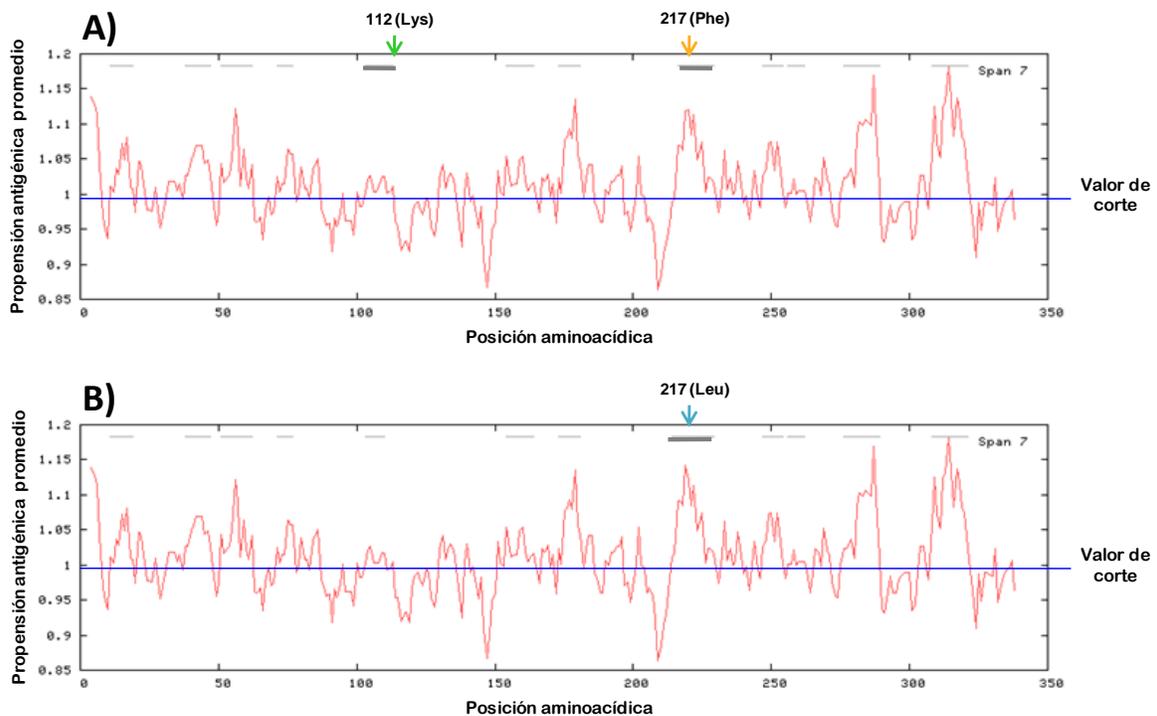


Fig. 23. Propensión antigénica de la proteína NS1 (A) nativa y (B) modificada. Los octapéptidos que rebasan el valor de corte de propensión antigénica son posibles epítomos lineales que se muestran como una línea horizontal gris en la parte superior de los gráficos.

Tabla 8. Determinantes antigénicos propuestos para la proteína NS1 nativa y modificada según el método de Kolaskar y Tongaonkar

Secuencia nativa		Secuencia modificada	
Posición aminoacídica	Secuencia	Posición aminoacídica	Secuencia
NS1 ₁₁₋₁₉	KELKCGSGI	NS1 ₁₁₋₁₉	KELKCGSGI
NS1 ₃₈₋₄₇	SPSKLASAIQ	NS1 ₃₈₋₄₇	SPSKLASAIQ
NS1 ₅₁₋₆₂	EEGICGIRSVTR	NS1 ₅₁₋₆₂	EEGICGIRSVTR
NS1 ₇₁₋₇₇	ITPELNH	NS1 ₇₁₋₇₇	ITPELNH
NS1₁₀₃₋₁₁₃	SLRPQPTELKY	NS1₁₀₃₋₁₁₀	SLRPQPTE
NS1 ₁₅₄₋₁₆₄	EVEDYGFGVFT	NS1 ₁₅₄₋₁₆₄	EVEDYGFGVFT
NS1 ₁₇₃₋₁₈₁	EKQDVFCD	NS1 ₁₇₃₋₁₈₁	EKQDVFCD
NS1₂₁₆₋₂₂₉	SFIEVKSCHWPKSH	NS1₂₁₄₋₂₂₉	KASLIEVKSCHWPKSH
NS1 ₂₄₇₋₂₅₄	FAGPVSQH	NS1 ₂₄₇₋₂₅₄	FAGPVSQH
NS1 ₂₅₆₋₂₆₂	YRPGYHT	NS1 ₂₅₆₋₂₆₂	YRPGYHT
NS1 ₂₇₆₋₂₈₉	DFDLCEGTTVVTE	NS1 ₂₇₆₋₂₈₉	DFDLCEGTTVVTE
NS1 ₃₀₈₋₃₂₁	ITEWCCRCTLPL	NS1 ₃₀₈₋₃₂₁	ITEWCCRCTLPL

9. DISCUSIÓN

La sintomatología inespecífica que presentan los pacientes durante los primeros días de la infección por DENV genera confusión con otras infecciones donde también se presentan cuadros febriles, como son influenza, rubeola, malaria, leptospirosis, fiebre amarilla, infección por rickettsias y rotavirus, de manera que el diagnóstico de dengue debe basarse en métodos altamente sensibles y específicos durante la etapa temprana de la enfermedad que permitan confirmar oportunamente los casos (Martínez, 2008; OMS, 2009).

Como ya se refirió en los antecedentes de este trabajo, la forma hexamérica del antígeno viral NS1 reúne características que permiten su detección en periodos tempranos de los cuadros clínicos del dengue, sin embargo, la sensibilidad reportada para el equipo comercial más utilizado a nivel mundial (Platelia™ Dengue NS1 Ag, BIO-RAD), corresponde al 91% (BIO-RAD, 2005) y en estudios posteriores se ha observado que la sensibilidad global varía de acuerdo a la población estudiada: Vietnam 83.1% (TyHang y cols., 2009), Malasia 93.3% (Kumarasamy y cols, 2007), Cambodia 57.5% (Doung y cols., 2011), Francia 88.7% (Dussart y cols., 2006), Puerto Rico 83.2% (Bessofo y cols., 2008), Brazil 95.9% (Castro y cols., 2010) y México 97% (Ruíz, 2010), de manera que el equipo debe ser evaluado en cada población donde se emplea para validar su utilidad diagnóstica y por ello, en este trabajo se incluyeron muestras con resultado negativo y positivo al ELISA de NS1 correspondientes al brote epidemiológico de dengue en 2010 en Veracruz, México.

Algunos reportes refieren que la diferencia en el análisis de sensibilidad del inmunoensayo para detectar NS1, se debe en parte a que la antigenemia para cada serotipo es distinta y al número de casos de infección primaria y secundaria analizados, puesto que en la infección secundaria la detección de NS1 disminuye por la presencia de anticuerpos neutralizantes (Kumarasamy y cols, 2007). Además, un estudio realizado en viajeros con destino a zonas endémicas de

dengue en Asia, América y África, reveló que al tratarse de serotipos, genotipos y cepas virales distintos, la sensibilidad de la detección de NS1 y del genoma viral (RT-PCR) se ven directamente afectadas. En este mismo estudio Huhtamo y cols., propusieron que el hallazgo de muestras positivas al RNA viral (RT-PCR positivas) con resultado NS1 negativo, pudiera deberse a una variación individual en la secreción de NS1 (Huhtamo y cols., 2010); en este sentido, aunque la sensibilidad es variable, está por arriba del 90% en la mayoría de las poblaciones estudiadas y su implementación representó un gran avance con respecto al algoritmo anterior donde se realizaba el aislamiento viral.

Como primer paso para el presente estudio, se seleccionaron muestras sin detección de anticuerpos IgG o IgM y con resultado negativo y positivo para el ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag, de manera que las muestras empleadas carecen de anticuerpos neutralizantes contra el antígeno viral NS1, así que los factores que impiden la detección de la proteína por el inmunoensayo, se centraron en propiedades virales, como las variaciones en la composición nucleotídica y aminoacídica de la molécula en cuestión.

Ahora bien, se sabe que de manera general la detección del genoma del DENV por RT-PCR es un método más sensible que la detección de la proteína NS1 por ELISA para el diagnóstico de la infección (Kumarasamy y cols, 2007; Huhtamo y cols., 2010; Doung y cols., 2011; Kassim, y cols., 2011), por lo que de inicio, se esperaba encontrar casos NS1 negativos con infección por DENV confirmada por la amplificación de la región C-prM por RT-PCR. Los resultados de este estudio, proponen que el 5% de las muestras NS1 negativas son RT-PCR positivas (figura 12), por lo que probablemente un porcentaje similar de casos de dengue es subestimado al realizar el diagnóstico mediante la detección del antígeno NS1 viral. Probablemente se identificaría un porcentaje mayor de estas muestras si se procesan muestras de reciente obtención, ya que cabe señalar que durante el algoritmo de diagnóstico rutinario, las muestras de suero son desechadas una vez que las determinaciones de NS1 y anticuerpos resultan negativas.

Para la estandarización de las condiciones de amplificación de la región NS1 viral, se diseñaron iniciadores para DENV-1 y -2, puesto que NS1 es una proteína serotipo-específica (Shu y cols., 2004; Puttikhunty cols., 2011) y los serotipos 1 y 2 son los más prevalentes en México, aunque esto no descartaba la presencia de otros serotipos infectantes. Lo antes mencionado se comprobó al amplificar la región NS1 en las 9 muestras NS1 negativo con detección del genoma viral (C-prM) encontrando que 7 de estas corresponden a DENV-2 y las 2 restantes muy probablemente a otro serotipo viral, ya que no presentaron amplificación con los iniciadores de DENV-1 y DENV-2. De acuerdo al Panorama Epidemiológico de Dengue 2010, 83% de los casos confirmados fueron ocasionados por el serotipo 1, 16% corresponden a DENV-2 y el 1% restante a DENV-3 y DENV-4 de los que no existe reporte para el estado de Veracruz (Secretaría de Salud, 2010), lo que indicaría que el número de casos reportados para cada serotipo viral también es subestimado, además de que la sensibilidad del equipo Platelia™ Dengue NS1 Ag parece estar en función del serotipo infectante, lo que ya ha sido planteado por diversos grupos de investigación que han comprobado que la cinética de NS1 en suero difiere en cuanto al serotipo viral y el estado inmunológico del hospedero (Shu y cols., 2004; Duyen y cols., 2011; Tricou y cols., 2011). Así, para este estudio, el orden de sensibilidad propuesto de acuerdo al serotipo viral sería el siguiente considerando la detección en muestras NS1 negativo y RT-PCR positivo: DENV-1> DENV-2> DENV-3 y DENV-4. Tomando en cuenta que el número de muestras analizadas es pequeño, sería conveniente realizar el mismo análisis aumentando su número para confirmar la relación entre sensibilidad del ELISA y serotipo infectante en la población estudiada, pues estos resultados difieren con los reportados por el fabricante (DENV-3>DENV-4> DENV-1>DENV-2: tabla 1), probablemente porque que la circulación de los serotipos virales en las áreas de estudio son distintas.

La existencia de cuatro serotipos del DENV se basa en la gran diversidad genética viral y dentro de ellos esta es mucho más restringida, pero suficiente para que existan genotipos virales (Holmes y Burch 2000). Como pudo observarse en el

análisis de corroboración de identidad, todas las secuencias NS1 negativo (grupo 1) y NS1 positivo (grupo 2) correspondieron a DENV-2 y presentaron elevada similitud con cepas mexicanas de años anteriores, aunque exhiben diferencias nucleotídicas que generan la diferencia genotípica. Lo antes mencionado fue demostrado en el análisis filogenético, en el que las secuencias del grupo 1 (NS1 negativo) y grupo 2 (NS1 positivo) procedentes del brote epidemiológico de dengue en Veracruz en 2010 guardan interrelación y se relacionan con secuencias de referencia de 2002, 2005 y 2008, pero no están relacionadas con las que corresponden a 1983 y 1992, lo que sugiere la constante variabilidad viral entre las cepas causantes de los brotes de dengue en México y un constante fenómeno de reemplazo de linajes virales, que concuerda con los reportes de Carilllo y cols. en 2010, quienes manifiestan la misma observación, así que podría explicarse el agrupamiento de las secuencias de las décadas de los años 1980 y 1990 (1983 y 1992) y las cepas de este estudio (2010) con las de los años 2002 a 2008 (década 2000-2010), como si pertenecieran a dos linajes distintos.

En el análisis de cambios nucleotídicos que pudieran asociarse a las secuencias NS1 negativo (grupo 1) al compararlas con las NS1 positivo (grupo 2), se localizaron posiciones con sustitución de nucleótido, que constituye el mecanismo más probable de generación de diversidad para el DENV (Holmes y Burch 2000; Holmes, 2009). Ahora bien, como se mostró en los resultados, existen 14 sustituciones nucleotídicas que podrían asociarse con el resultado del inmunoensayo para detectar la proteína, sin embargo, aunque la proporción de cambios fenotípicos generados (cambios de aminoácido) es baja (2/14), estos resultados son bastante representativos, puesto que un análisis en México de la secuencia de la proteína E donde se buscaron diferencias nucleotídicas asociables a la gravedad de la enfermedad sólo se refirió el hallazgo de una sustitución que no genera cambio de aminoácido, explicando que esto sucede porque la evolución del DENV ocurre principalmente por selección negativa, sin embargo, estos cambios coordinados a nivel de nucleótido pueden ser vistos como categorías sistemáticas de organización (Rivera-Osorio y cols., 2011). Al

comparar la secuencias nucleotídicas del grupo 1 (NS1 negativo) del año 2010 con secuencias de referencia de los años 1983-2010, se observó que algunos cambios nucleotídicos se deben más bien a que existe reincidencia de las cepas.

Por lo que respecta al análisis de variabilidad o diversidad genética, podemos observar que tratando las muestras NS1 negativas y positivas (conjuntos 1 y 2) como conjuntos independientes, el resultado de diversidad media es bajo, por lo que la variabilidad entre las secuencias de cada conjunto también lo es, es decir, éstos tienen una composición bastante homogénea. Ahora bien, cuando se analizan todos los cambios ocurridos para cada posición nucleotídica en la región NS1 tomando en cuenta el tamaño del conjunto (estimador θ), encontramos que las secuencias de referencia (Gen Bank 1983-2008) son muy diversas entre sí y no pueden ser objeto de comparación con las secuencias NS1 negativas (conjunto 1) así que la evaluación de cambios nucleotídicos sólo puede aplicarse para estas y las NS1 positivo (conjunto 2) que corresponden al mismo brote epidémico. Al comparar únicamente estos conjuntos, podemos observar que la región de mayor diversidad exclusiva de las secuencias NS1 negativo (750-1000 b) coincide con las sustituciones que se presentan con mayor frecuencia (NS1₈₁₀ A→G, NS1₈₁₃ T→C, NS1₈₃₁ T→C, NS1₈₆₁ G→A, NS1₈₆₄ T→C, NS1₉₈₇ C→T). Hasta la fecha, no existen reportes de cambios nucleotídicos y aminoacídicos en la región NS1 que ocasionen un resultado negativo para el ELISA, únicamente se cuenta con reportes de variaciones en esta región debidos a pase en cultivo celular (Wei-June y cols., 2003) o con base en el genotipo infectante (Leitmeyer y cols., 1999; Barreto y cols., 2002), de manera que los resultados obtenidos en este estudio son los primeros en sugerir una asociación entre la variación nucleotídica del genoma viral y la detección de la proteína NS1 del DENV por ELISA. Por lo que respecta a los cambios de aminoácido atribuidos a la negatividad de la detección de NS1 por ELISA, es necesario considerar que la predicción de su presencia en sitios antigénicos fue realizada por un método de predicción de epítomos lineales, lo que no descarta la participación de estos aminoácidos en epítomos conformacionales, los cuales no se predijeron para la proteína NS1 puesto que hasta el momento se

desconoce su estructura. En base a propiedades fisicoquímicas, el cambio aminoacídico ocurrido en la posición 217 (Phe→Leu) podría no ser tolerable al ocurrir entre aminoácidos de diferente grupo, pues generalmente el aminoácido aromático Phe se intercambia por otro con las mismas propiedades (hidrofóbico con interacción con cadenas aromáticas y cadena lateral funcional para unión/reconocimiento de ligandos hidrófobos), no como en este caso con Leu, un aminoácido alifático (Rusell y cols., 2013). Sin embargo, el análisis de Kolaskar y Tongaonkar reveló que esta posición con el cambio a Leu sigue incluyéndose como parte de un sitio antigénico. Para descartar la participación de este cambio en el resultado del ELISA de NS1 se sugiere realizar estudios posteriores ya que podría o no ser parte de un epítipo lineal o conformacional.

Para el caso de la sustitución de aminoácido en la posición 112 (Lys→Arg) de secuencias NS1 negativo, este podría no generar ningún cambio a nivel de interacciones entre los aminoácidos de la proteína NS1, puesto que Lys (caracterizada por poseer carga positiva, polar, ubicación externa en las proteínas y formación de enlaces puente de hidrógeno) presenta frecuentemente sustitución con Arg ya que las propiedades de carga, polaridad y estabilidad no se modifican (Rusell y cols., 2013). Un estudio de epítopos lineales en formas diméricas de NS1 de DENV-2, demostró sitios antigénicos lineales entre los que se encuentra el denominado 1A12.3, que abarca los aminoácidos 112-120 (Falconar y Young, 1991; Muller y cols., 2012) y que permite sugerir que si esto se cumple también en la forma soluble de NS1 (hexámero) y este epítipo lineal es reconocido por los anticuerpos monoclonales del ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag, el cambio a Arg podría estar implicado en la negatividad de la prueba. Además el análisis de Kolaskar y Tongaonkar para esta posición aminoacídica mostró que la sustitución de Lys por Arg deja de incluir esta posición en un sitio antigénico.

Finalmente, es importante considerar que en este trabajo sólo se compararon secuencias DENV-2 NS1 negativo y NS1 positivo al ELISA, por lo que los resultados obtenidos no pueden generalizarse para los cuatro serotipos del DENV

pues exhiben diferencias de antigenicidad. También debe considerarse que el inmunoensayo tiene un límite de detección en el que las muestras con una concentración menor no son detectadas, sin embargo este estudio demostró que si existe relación en la composición nucleotídica de la proteína NS1 y el resultado de la detección de la proteína por ELISA.

10. CONCLUSIONES

- Se estandarizaron las condiciones de reacción para amplificar por RT-PCR la región NS1 del genoma del DENV-1 y DENV-2 utilizando primers serotipo-específicos diseñados para este fin.
- Se amplificó y secuenció la región NS1 del DENV de 9 muestras positivas y 7 negativas a la detección de NS1 por ELISA, encontrando al DENV-2 como serotipo infectante.
- Se demostró la existencia de mutaciones en la región NS1 del genoma del DENV-2 que da lugar a cambio de aminoácido en epítomos lineales lo cual puede contribuir a explicar la falta de detección de la proteína por ELISA en el diagnóstico de casos de dengue.

11. PERSPECTIVAS

Seleccionar sueros de reciente obtención en un mismo brote epidémico correspondientes a los cuatro serotipos del DENV con la finalidad de aumentar el hallazgo de muestras NS1 negativas por ELISA con detección positiva del genoma viral para realizar un análisis bioinformático de la secuencia NS1 semejante al de este estudio para los cuatro serotipos virales y comparar con los resultados obtenidos hasta ahora para el serotipo 2.

12. REFERENCIAS

Aaskov, J. (2003) Infectious Diseases: Dengue. *Journal of the Australian Defense Health Service* 4: 62-67.

AcostaC, Gómezl. (2005) Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*16:113-137.

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V and Flamand M. (2002) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology* 40:376–381.

Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. (2007) Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathogens* 3(11): 1798-1812.

Ayllón, L. (2006) Some basic aspects on the evolution of the RNA virus: medical importance. *Revista Cubana de Investigación en Biomedicina* 25(3): 2-7.

BarretoF, Miagostovich MP, Nogueira RM, Edgil D, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. (2002) Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus Type 2 Strain. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(7): 991-995.

Bessoff K, Delorey M, Sun W and Hunsperger E. (2008) Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV infection. *Clinic and Vaccine Immunology*, 15:1513-1518.

BIO-RAD. (2005) *Platelia™ Dengue NS1 Ag.* Cat. No. 72830

Bremo, A. y Gonzatti, M. (2011) Modelaje molecular y predicción de epítopes de bovispaína, una cistein peptidasa de *Babesiabovis*. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Venezuela. 9-11.

Cabezas, C. (2011) 21 años de la re-emergencia del Dengue en Perú: una enfermedad crónicamente anunciada. *Diagnóstico*, 50(3); 36-41.

Calvo J, Martínez ME, Patarroyo F, Satterthwait A. (2003) De la predicción al análisisantigénico: tras las huellas de un epítope conformacional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y naturales*,27(102):133-140.

Carrillo E, Danis R, Velasco JX, Sánchez G, Alpuche C, López I, Rosales C, Baronti C, de Lamballerie X, Holmes EC and Ramos JR. (2010) Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Archives of Virology*.

Castro J, Machado P, Fávero CA, Borges MC, Passos LM, Moreira de Oliveira R and Fonseca B. (2010) Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil. *Journal of Medical Virology*, 82:1400-1405.

Clyde K, Kyle JL and Harris E. (2006) Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23): 11418-11431.

Domingo, Ey Holland, J. (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, 51:151–178.

Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, Matheus S and Baril L. (2006) Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13:1185–1189.

Duong V, Ly S, Lorn P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeng N, Lundkvist A, Leparc I, Deubel V, Vong S, Buchy P. (2011) Clinical and Virological Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen-Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(7): e1244-e1256.

Duyen H, Ngoc T, Ha D, Hang V, Kieu N, Young P, Farrar J, Simmons C, Wolbers M, Wills B. (2011) Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status. *The Journal of Infectious Diseases*.203:1292–1300.

Falconar, A. y Young, P. (1991) Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive Mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *Journal of General Virology*, 72, 961-965.

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA and Deubel V. (1999) Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology*, 73(7): 6104-6110.

Gibbons, R y Vaughn D. (2002) Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*, 324:1563-1566.

Gulati, S and Maheshwari, A. (2007) Atypical manifestations of dengue. *Tropical Medicine and International Health*, 12(9): 1087-1095.

Gutschea I, Coulibalya F, Vossb J, Salmone J, d'Alayerf J, Ermonvalc M, Larqueth E, Charneauc P, Kreyb T, Mégretc F, Guittetj E, Reya F, Flamand M. (2011) Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19): 8003–8008.

Gubler DJ and Kuno G. (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 480-496.

Halstead, S. (2008) Tropical Medicine: Science and Practice. International Vaccine Institute, Korea. 1,2,9.

Holmes, E. y Burch, S. (2000) The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends in Microbiology*, 8(2): 74-80.

Holmes, E. (2009) RNA virus genomics: a world of possibilities. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9): 20092488-2495.

Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O and Piiparinen H. (2010) Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology* 47: 49-53.

Idrees S y Ashfaq U. (2012) A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genetic Vaccines and Therapy*, 10(6): 1-10.

Jacobs M, Robinson P, Bletchly C, Mackenzie JM and Young P. (2000) Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidyl inositol-linked form that is capable of signal transduction. *Journal of Federation of American Societies of experimental Biology*, 14(11): 1603-1610.

KassimF, Nur M, Rogayah T, Mohd Y and Saat Z. (2011) Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine of Public Health*, 42(3): 562-569.

Knipe, D. y Howley, ED. (2007) Fields Virology. 5° edición. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1102-1110.

Kolaskar, A. y Tongaonkar, P. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, 276(1,2): 172,174.

KumarasamyV, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M and Chua KB. (2007) Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *Journal of Virological Methods*, 140:75-79.

Kurosu, T. (2011) Quasispecies of dengue virus. *Tropical Medicine and Health*, 39(4): 29-36.

Lanciotti R, Calisher C, Gubler, D, Chang G, Vorndam A. (1992) Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30(3):545–551.

Laughlin C, Morens D, Cassetti C, Costero A, San Martin JL, Whitehead S, Fauci AS. (2012) Dengue Research Opportunities in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases*, 206: 1121–7.

Lemos, G. (2006) Dengue, un problema social reemergente en América Latina. Estrategia para su erradicación. *Biotecnología Aplicada*, 23(2): 129-136.

LeitmeyerK, Vaughn D, Watts D, Salas R, Villalobos I, de Chacon C and Rico-Hesse R. (1999) Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(6): 4738-4747.

Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S. (2002) High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 186:1165–8.

Martínez, E. (2008) Dengue. *Estudios Avanzados*, 22(64): 33-52.

Muller, D. (2010) Dengue virus non-structural protein NS1: Structure, intracellular trafficking and role as a diagnostic marker. *University of Queensland, Australia*, 7-11.

Muller D, Landsberg M, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B and Young P. (2012) Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *Journal of General Virology*, 93: 771–779

Ojosnegros, S. (2008) Dinámica evolutiva de virus RNA. Universidad Autónoma de Madrid, España. 15-27.

Organización Panamericana de la Salud Honduras (2011). Lineamientos del manejo clínico de pacientes con dengue. Secretaría de Salud, Honduras. 21-46.

Organización Mundial de la Salud. (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Geneva, Switzerland.

Puttikhunt C, Prommool T, U-thainual N, Ong-ajchaowlerd P, Yoosook K, Tawilert C, Duangchinda T, Jairangsri A, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Kasinrerak W. (2011) The

development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus. *Journal of Clinical Virology*, 50(4): 314-319.

Rothman, A. L. (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews Immunology*, 11: 532-543.

Rodenhuis I, Wilschut J, Smith J. (2010) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell and Molecular Life Sciences*, 67: 2773-2786.

Rivera P, Vaughan G, Ramírez JE, Fonseca S, Ruiz K, Cruz MY, Ruíz JA, Vázquez M, Carpio JC, Cázares FR, Escobar A. (2011) Molecular Epidemiology of Autochthonous Dengue Virus Strains Circulating in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9): 3370-3374.

Ruíz, K. (2010) Detección de casos de dengue mediante la determinación temprana de la proteína NS1 viral por citometría de flujo. IPN-ENCB, México. 2-7,11, 39.

Secretaría de Salud. (2008) Procedimiento para la aplicación del nuevo Algoritmo para Diagnóstico por Laboratorio de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Secretaría de Salud, México. 5-9.

Secretaría de Salud. (2008) Manejo del dengue grave y el dengue no grave. CENETC, México. 11-19, 33-37, 50, 51.

Smit J, Moesker B, Rodenhuis I and Wilschut J. (2011) Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses*, 3: 160-171.

Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH and Huang JH. (2003) Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10:622–630.

Tricou V, Nguyen N, Farrar J, Tinh H, Simmons C. (2011) Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia Are Shaped by Immune Status and Virus Serotype in Adults with Dengue. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(9): e1309-e1319.

Ty HangY, Minh N, The Trung D, Tricou V, Yoksan T, Van T, Tinh T, Farrar J, Wills B, Simmons C. (2009) Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(1): e360-e367.

Velandia M y Castellanos J. (2011) Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Asociación Colombiana de Infectología*, 15(1): 33-43.

WahalaM, Wahala P and Aravinda M. (2011) The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses*, (3): 2374-2395.

Wallis T, Huang C, Nimkar SB, Young P, Gorman JJ. (2004) Determination of the Disulfide Bond Arrangement of Dengue Virus NS1 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20): 20729–20741.

Wei-June C, Hsin-Rong W, Shyang-Song C. (2003) E/NS1 Modifications of Dengue 2 Virus after Serial Passages in Mammalian and/or Mosquito Cells. *Intervirology*, 46:289-295.

Yábar, C. (2003) Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del RNA del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del RNA. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 20:51-57.

Young P, Hilditch P, Bletchly C and Halloran W. (2000) An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3): 1053-1057.

URL

Cell Networks Protein Evolution. *Amino acid Properties*. Consultado el 15 de marzo de 2013. Disponible en: <http://www.russelllab.org/aas/>

IBDE Analysis Resource. *Epitope prediction*. Consultado el 10 de mayo de 2013. Disponible en: <http://tools.immuneepitope.org>

Universidad Complutense de Madrid. *Predicted Antigenic Peptides*. Consultado el 28 de marzo de 2013. Disponible en: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>

Secretaría de Salud. *Panorama epidemiológico de dengue 2010*. Consultado el 04 de enero de 2013. Disponible en: www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue

Secretaría de Salud. *Panorama epidemiológico de dengue 2010*. Consultado el 04 de enero de 2013. Disponible en: www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_dengue.

University of Florida. *Invasion Biology of Aedes albopictus*. Consultado el 03 de diciembre de 2012. Disponible en: <http://fmel.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>